

Biochemische und molekulare
Charakterisierung der im malignen
Melanom exprimierten Moleküle MUC18,
MUC54 und Modul18

Jürgen Lehmann

1989

Disbui. München

1989

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Biochemische und molekulare
Charakterisierung der im malignen
Melanom exprimierten Moleküle MUC18,
MUC54 und Modul18**

vorgelegt von Jürgen Lehmann
am

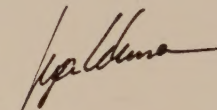
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von Paragraph 12 (3) der Promotionsordnung vom 5. März 1981 von Prof. Dr. G. Riethmüller betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Die vorliegende Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, Februar 1989



Jürgen Lehmann

Dissertation eingereicht am

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Riethmüller
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung am

7. Juni 1989

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Das Melanomsystem - Eine kurze Einführung:	4
Material und Methoden	13
Antikörper, Gewebe und Zelllinien.	13
Zellfusion.	14
Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper.	16
Immunhistochemie.	16
Anfertigung von Zytospin Präparaten	17
Immunfluoreszenz.	18
Immunpräzipitation.	18
Neuraminidaseverdau des Immunpräzipitates	19
Glycopeptidase-F Verdau des Immunpräzipitates	20
Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	20
Western blotting.	22
Synthese und Klonierung doppelsträngiger cDNS in den Expressionsvektoren	
Lambda gt10 und Lambda zap.	23
mDNS Isolierung 23: cDNS Synthese 24: EcoRI Methylierung 25: Fill in Reaktion	
mit der Klenow Polymerase 25: Anbau synthetischer EcoRI Linker 26: Größen-	
selektionierung der cDNS und Abtrennen nicht ligierter EcoRI Linker 26:	
Ligation mit Lambda-Vektor 27: Ausplattieren der Genbank 27: in vitro packaging 27:	
Immunoscreening der Lambda Genbanken.	29
Präparation von Phagen DNS.	30
Restriktionsverdau.	30
Exonuklease III Verdau -Erase a Base!	31
Nuclease Bal31 Verdau	32
Oberführung von 3'überhängenden Enden in glatte Enden	32
Um- Subklonierung in pUC Plasmide	33
Herstellung kompetenter E.coli Bakterien zur DNS Transformation	34
Mini-Präparation von Plasmid DNS.	34
Mid-Präparation von Plasmid DNS.	35
Maxi-Präparation von Plasmid DNS.	37
Genomische DNS - Schnellpräparation	37
Southern blotting	38
Northern blotting	39
Denaturierendes RNS Gel	39
Random Primer Labelling	40
Southern und Northern Blot Hybridisierung mit radioaktiven Proben	41
DNS Sequenzieren mit Sequenase.	42
Denaturieren doppelsträngiger cDNS 42: Sequenzierungsreaktion 42:	
Herstellung eines DNS Sequenziergeles	44
Nährmedien und Puffer	45
Genotyp der Bakterienstämme	46

Ergebnisse und Diskussion.	47
Expression der von MoAk MUC18 und MUC54 erkannten antigenen Determinanten in der Melanozyten Linie	47
Expression der durch MoAk MUC18 und MUC54 definierten Antigene in Verlauf der Tumorprogression in der Melanozyten Linie	51
Reaktion der MoAk MUC18 und MUC54 mit operativ entfernten Normal- und Tumorgewebe	54
Reaktion der MoAk MUC18 und MUC54 mit Zelllinien	57
Biochemische Charakterisierung der durch die MoAk MUC18 und MUC54 definierten Antigene.	58
Isolierung der gegen das denaturierte MUC18 Antigen gerichteten MoAk MUC8A18.1-18.5	60
cDNA Klonierung des MUC18 Antigens.	62
MUC18 mRNA und genomische DNA	65
Nukleotid- und Aminosäuresequenz des MUC18 Glykoproteins.	69
MUC18 ist ein neues Mitglied der Immunglobulin Supergenfamilie.	73
Modul18, ein neues Protein mit Sequenzähnlichkeit zu src-verwandten Tyrosinkinasen.	77
Modul18 mRNA und genomische DNA	77
Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Modul18 Proteins	80
Modul18 zeigt Sequenzähnlichkeit zur nicht-katalytischen Domäne der src-verwandten Tyrosinkinasen	83
Literaturverzeichnis.	89
Abkürzungen	97

Zusammenfassung

Die Suche nach monoklonalen Antikörpern (MoAk), die gutartige von bösartigen melanozytären Gewebsveränderungen unterscheiden können, hat zur Identifizierung zweier bisher nicht bekannter Moleküle geführt. Bei dem einen handelt es sich um ein monomeres membranständiges Glykoprotein (MUC18) mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 113.000 Dalton, das andere stellt ein monomeres zytoplasmatisches Protein (MUC54) mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 76.000 Dalton dar. Die Untersuchung der Expression dieser Antigene auf melanozytären Gewebsveränderungen verschiedener Progressionsstadien ergab, daß die Expression des MUC54 Proteins mit dem Vorhandensein einer gesteigerten Aktivität und Zellatypie in Nävi korreliert ist. Das MUC18 Glykoprotein wurde weder von den untersuchten Nävuszell Nävi, den dysplastischen Nävi, noch von den frühen primären Melanomen (d.h. Tumordicke $\leq 0,75\text{mm}$) in der radialen Wachstumsphase exprimiert. Erst mit dem Eintritt in die vertikale Wachstumsphase und einer Zunahme der Tumordicke, dem sogenannten Breslow Index, ließ sich eine Expression von MUC18 nachweisen. Diese nahm in Abhängigkeit von einem weiteren Ansteigen der vertikalen Tumordicke zu. Da der Breslow Index den derzeit besten prognostischen Parameter für die Metastasenentwicklung darstellt, könnte die Expression von MUC18 auf Melanomzellen dazuführen, daß diese mit einer Eigenschaft ausgestattet werden, die bei der erfolgreichen Metastasierung beteiligt ist. Eine zweite Runde von MoAk (MUCBA18.1-18.5), die gegen das denaturierte MUC18 Glykoprotein induziert wurde, ist zum Screening einer humanen Melanom-Expressions-Genbank verwendet worden. Sechs überlappende cDNA-Klone, die mit einer einzelnen 3.300b mRNA-Bande hybridisieren, wurden isoliert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz definiert ein Protein von 575 Aminosäuren, dessen extrazellulärer Anteil aus fünf immunglobulinähnlichen Domänen besteht. Die stärkste Sequenzähnlichkeit wurde zum neuronalen Adhäsionsmolekül L1, zum Myelin associated glycopro-

tein (MAG), zum Neural cell adhesion molecule (N-CAM) und zum Carcinoembryonic antigen (CEA) beobachtet. Die Verwandtschaft zu diesen Proteinen ist von besonderem Interesse, da gezeigt werden konnte, daß insbesondere die beiden Moleküle N-CAM und MAG in der embryonalen Entwicklung Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Es kann daher vermutet werden, daß das MUC18 Glykoprotein eine vergleichbare Funktion erfüllt.

Ein weiterer cDNS Klon, drop6, dessen Sequenz für ein Protein (Modul18) mit einem Molekulargewicht von 42.540 Dalton kodiert, wurde aufgrund seiner Kreuzreaktivität mit den 'Western blotting Antikörpern' isoliert. Dieses Protein scheint aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften zytoplasmatisch lokalisiert zu sein, und zeigt eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit zur nicht-katalytischen Domäne der src-verwandten Tyrosinkinasen. Es wird daher spekuliert, daß das Modul18 Protein einen regulatorischen Einfluß auf die enzymatische Aktivität von Tyrosinkinasen des Nichtrezeptortyps und Phospholipase C ausübt. Störungen in der Regulation von Modul18 Expression würden demzufolge die Signalübermittlung innerhalb der Zelle nachhaltig beeinflussen und könnten zu deren Transformation beitragen.

Einleitung

Ein Tumor, meist klonal in seinem Ursprung, entwickelt sich Schritt für Schritt zu einem heterogenen Gewebe, dessen Zellen sich durch die Expression bestimmter Moleküle und den damit verbundenen Fähigkeiten unterscheiden. Erweist sich dabei eine neu erworbene Fähigkeit als vorteilhaft, so verdrängen diese Subklone ihre Vorläufer (Nowell,1976). Jeder Schritt spiegelt die Aktivierung, die Mutation oder den Verlust von Genen wider und versetzt den Tumor in die Lage, sich wechselnden Erfordernissen anzupassen. Dieser von einer ständigen Dynamik geprägte Vorgang wird als Tumorprogression (Foulds,1954) bezeichnet und führt zu einem Tumor, der sich aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellpopulationen mit einem weiten Spektrum unterschiedlichster Charakteristika (Cairns,1975; Klein,1979; Nowell,1976) zusammensetzt. Der heterogene Phänotyp eines Tumors verkörpert dabei Fähigkeiten, die die Morphologie und das zelluläre Verhalten einer Tumorzelle (Foulds,1975; Nicholson and Milas,1984) schrittweise dahingehend verändern, daß diese sich zunehmend Wachstumskontrollmechanismen entzieht und sekundäres Wachstum initiieren kann. Der Metastasierungsprozeß (Poste and Fidler,1980; Fidler and Hart,1982) beginnt mit der lokalen Invasion des umliegenden Wirtsgewebes durch den Primärtumor. Um zur Disseminierung in den Körperkreislauf zu gelangen, dringen Tumorzellen in das vaskuläre/lymphatische System ein. Im Kapillarbett, häufig spezifischer Organe, adhärieren sie an das Gefäßendothel, penetrieren, und proliferieren im Interstitium des jeweiligen Gewebes zu einer Metastase. Während dieses Prozesses muß die Tumorzelle sowohl der mechanischen Zerstörung als auch den zytotoxischen Mechanismen des sie bekämpfenden Immunsystems (Klein,1980) widerstehen. Mißlingt es der Tumorzelle auch nur einen dieser konsekutiven Schritte zu vollenden, wird sie eliminiert. Erfolgreich metastasierende Tumorzellen sind somit darauf angewiesen, neben ihrem Wachstumsvorteil zahlreiche neue Eigenschaften zu erwerben. Damit wird deutlich, daß Tumorzellen ein zu

normalen Zellen qualitativ unterschiedliches Antigenmuster exprimieren.

Insbesondere die Fähigkeit von ingezüchteten Mäusen UV-Licht, chemisch oder virusinduzierte syngene Tumortransplantate abzustoßen (Prehn and Main, 1957; Kripke, 1974), weisen auf das Vorhandensein individueller Tumorantigene hin. Es scheint jedoch, daß derartige tumorspezifische Antigene, deren Existenz auch in einzelnen Tumorpatienten nachgewiesen wurden, vornehmlich von MHC restringierten zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Allerdings lassen sich auch sehr vereinzelt bei Tumorpatienten Antikörper nachweisen, die selektiv mit dem Tumor reagieren. Diese polyklonalen durch Preabsorption an autologen Leukozyten oder Fibroblasten gereinigten Antisera (Shiku et al., 1978) reagierten dann spezifisch mit den Tumorzellen, erwiesen sich jedoch mit wenigen Ausnahmen (Watanabe et al., 1982; Cahan et al., 1982) als zu komplex bzw. zu schwach, um die entsprechenden Antigene zu isolieren und anschließend näher zu charakterisieren. Mit Hilfe der Hybridomtechnik (Köhler and Milstein, 1975) gelingt es nun hochspezifische Reagenzien, die monoklonalen Antikörper, herzustellen und der Frage nachzugehen, ob die postulierten molekularen Veränderungen in Tumorzellen existieren und sich nachweisen lassen (Koprowski et al., 1978).

Das maligne Melanom der Haut bietet sich aufgrund zahlreicher Vorteile als besonders geeignetes Modellsystem für derartige Untersuchungen an.

Das maligne Melanom

Die stufenweise ablaufende Entwicklung (Clark et al., 1984) des malignen Melanoms der Haut beginnt mit der Proliferation einzelner Melanozyten in der Basalschicht der Epidermis. Als Melanozyten bezeichnet man die während der Embryogenese aus der Neuralleiste in die Epidermis eingewanderten Zellen, die den Hautpigmentfarbstoff Melanin produzieren.

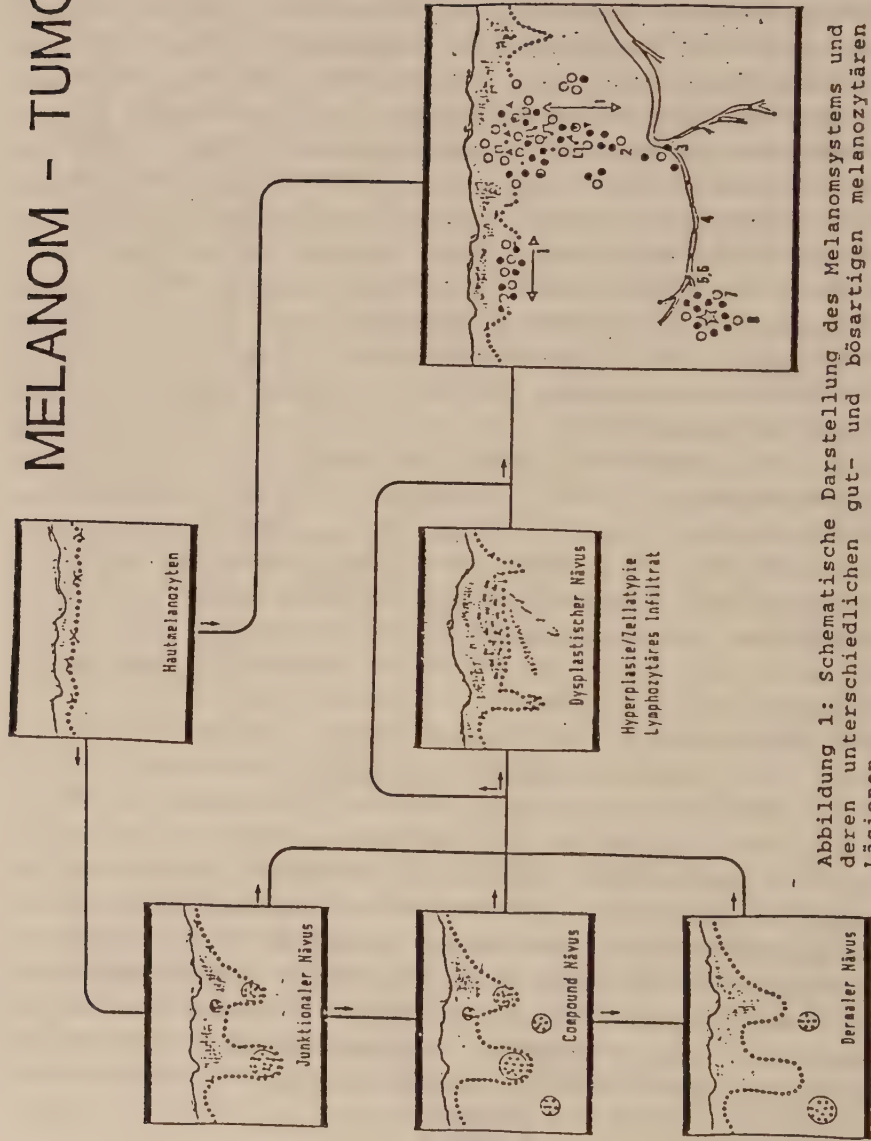
Die sich horizontal ausbreitende Proliferation einzelner Melanozyten führt im weiteren Verlauf zur Bildung einzelner

Foci. Später erscheinen mehr und mehr atypische Melanozyten in der Epidermis, zuerst vereinzelt, dann in Nestern, die sich kontinuierlich ausdehnen. Nach der Hauptwachstumsrichtung unterscheiden Clark et al. (1967) zwei Formen, das vornehmlich horizontal wachsende oberflächlich spreizende Melanom (superficial spreading melanoma) und das noduläre (nodulary melanoma), das vornehmlich vertikal in die Tiefe wächst. Mit fortschreitender Tumorprogression beginnen atypische Melanozyten aus der Epidermis in die Dermis einzudringen und durchbrechen dabei die Basalmembran. Mit ansteigender Eindringtiefe, gemessen als Breslow Index (Breslow, 1970), erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Metastasenbildung. Dieser Index hat sich aufgrund seiner strengen Korrelation mit der Metastasierung als ein hervorragender prognostischer Parameter der Tumorprogression erwiesen. So zeigen primäre Melanome mit einer Eindringtiefe $\leq 0.75\text{mm}$ eine 99% 5 Jahresüberlebensrate, während sie bei Patienten mit einem Melanom von $\geq 3.0\text{mm}$ Eindringtiefe nur noch 60% beträgt (Sober, 1984).

Neben der malignen Form existiert die benigne Gewebsveränderung des Nävuszell Nävus, gutartig proliferierende Melanozyten, die die typischen Charakteristika von proliferierenden und aktivierten Zellen aufweisen. Der Nävuszell Nävus entsteht in den frühen Jugendjahren durch Proliferation von Melanozyten auf der Reteleiste, und formt dort sogenannte Nävusnester. Sind die Nävusnester in der Epidermis lokalisiert, spricht man von einem Junktionsnävus. Im weiteren Verlauf der Kindheit bis hinein ins Erwachsenenalter beginnen Nävuszellen vom proliferierenden junktionalen Nävus 'abzutropfen', man spricht vom sogenannten Compound Nävus. Sind schließlich sämtliche junktionalen Anteile in der Dermis lokalisiert, handelt es sich um einen Dermalen Nävus (McGovern, 1983).

Zur Definition eines histologisch atypischen Phänotyps des Nävus wurde der von Elder et al. (1982) eingeführte Begriff des dysplastischen Nävus verwendet. Dieser Terminus beschreibt die Anhäufung morphologisch atypischer Melanozyten, die von einem starken lymphozytären Infiltrat

MELANOM - TUMORMODELL



- 1 Hor radiales
- 2 Lokale Invasion des Wirtsgewebe
- 3 Eindringen in das vaskuläre/lymphatische System
- 4 Zirkulation
- 5 Festsetzen im Kapillarbett entfernter Organe
- 6 Durchtritt durch das Gefäßendothel in das Organewebe
- 7 Infiltrierung von sekundären Wachstum
- 8 Melanommetastase

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Melanomsystems und deren unterschiedlichen gut- und bösartigen melanozytären Läsionen.

begleitet sind. Da das Auftreten einer großen Anzahl dieser Nävi in der vererbbaeren Krankheit des familiären dysplastischen Nävusyndrom zur Entstehung von multiplen Melanomen führt, wird postuliert, daß es sich bei diesen Nävi um direkte Vorläufer des Melanoms handelt. Von Kraemer et al. (1983) konnte für den dysplastischen Nävus ein 26-fach höheres Entartungsrisiko im Vergleich zum Nävus nachgewiesen werden. Allerdings wird der dysplastische Nävus als eine eigenständige Gewebsveränderung mit histopathologischen Eigenschaften, sowohl des Nävuszell Nävus als auch des 'Melanoma in situ', in der Literatur kontrovers diskutiert (Ackerman and Mihara, 1985).

* * *

Die Lokalisation in der Haut verbunden mit der Pigmentierung ermöglicht es, Veränderungen an Melanozyten wesentlich früher als bei Tumoren anderer Organe zu erkennen. Da sich derartige Gewebsveränderungen vergleichsweise einfach entfernen lassen, ist ein problemloser Zugang sowohl zu dem benignen Nävuszell Nävus, dem dysplastischen Nävus als auch zu sehr frühen malignen Veränderungen der Melanozyten möglich. Es lassen sich somit Veränderungen im Antigenmuster, die im Zusammenhang mit der Entstehung eines spontanen soliden Melanoms stehen, studieren. Durch die lineare Korrelation der Tumordicke (Breslow Index) mit dem Auftreten von Metastasen, ist es darüber hinaus möglich, Veränderungen im Antigenmuster während der Tumorprogression mit der Metastasierung in Beziehung zu setzen. Ein weiterer Vorteil des Melanomsystems liegt in der bereits großen Anzahl von existierenden Melanomzelllinien und der Möglichkeit, daß sowohl Melanozyten (Eisinger and Marko, 1982) als auch Nävuszellen (Herlyn et al., 1984) für einen kurzen Zeitraum in Zellkultur genommen werden können. Somit sind in vitro Studien wie auch biochemische Untersuchungen zu den Antigenen möglich. Natürlich wurden diese Vorteile auch von vielen Labors erkannt, sodaß immunologisch gesehen das Melanom zu den bestuntersuchtesten Tumoren gehört und schon frühzeitig eine große

Anzahl von monoklonalen Antikörpern gegen das Melanom produziert wurden. Die bedeutendsten wurden in Übersichtsartikeln (Johnson et al., in press; Herlyn and Koprowski, 1988) mehrfach besprochen und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Während einige dieser Antigene, Zellen der melanozytischen Linie (Gangliosid GD3, Chondroitinsulfat Proteoglykan Komplex)

Tabelle 1: Melanom-assoziierte Antigene und ihre Expression auf melanozytären Zellen

Antigen	Antikörper	Antigen Expression				Referenzen
		Haut Melanozyten	Nävuszell Nävi	Primäres Melanom	Melanom Metastase	
GD3	R24					Dippold et al., 1980
S100	S100					Gown et al., 1986
p97	96.5					Woodbury et al., 1980
proteo- glycan	9.2.2.7					Morgan et al., 1981
	225.24S					Wilson et al., 1981
Nacan-1	AMF-7					DeVries et al., 1986
NGFR	MB20.4					Ross et al., 1984
ICA p30-p60	LS62					Sikora et al., 1987
	MB491					Atkinson et al., 1985
K-1-2	K-1-2					Suter et al., 1985
GP120	S27					Finstad et al., 1985
TNKH1	TNKH1					Nakanishi & Hashimoto, 1987
BNB45	BNB45					Gown et al., 1986
PAL-M1	PAL-M1					Ruiter et al., 1985
2-139-1	2-139-1					Kan-Mitchell et al., 1986
6-26-3	6-26-3					Kan-Mitchell et al., 1986
CLIP-M	45KD, 12KD					Rothbächer in Vorbereitung
GD2	14.14					Cheresh et al., 1984
15.75	15.75					Johnson et al., 1981
MUC54	MUC54					Lehmann et al., 1987
GP130	A-1-43					Brüggen & Sorg, 1983
	MUC18					Lehmann et al., 1987
P3.58/ICAM	P3.58					Holzmann et al., 1985
HLA-DR	L243					Lampson & Levy, 1980
EGFR	425					Herlyn & Koprowski, 1988

Antigenexpression auf melanozytären Zellen. Die Daten wurden folgenden Literaturstellen entnommen:

Atkinson et al., 1985; DeVries et al., 1986; Garrigues et al., 1982; Gown et al., 1986; Herlyn et al., 1987; Hershey et al., 1984; Holzmann et al., 1985; Holzmann et al., 1987; Houghton et al., 1987; Kan-Mitchell et al., 1986; Nakanishi und Hashimoto et al., 1987; Ross et al., 1984; Sikora et al., 1987; Wilson et al., 1981. Der Anteil positiv mit den Antikörper reagierender Zellen wurden in 3 Reaktionsgruppen unterteilt: weiß <20% positive Zellen  20-70% positive Zellen  >70% positive Zellen

kennzeichnen, werden andere nicht auf Melanozyten, jedoch bis auf wenige Ausnahmen gleichermaßen auf benignen Nävi wie auch Melanomen gefunden. Sie können somit nicht als Transformations assoziierte Marker angesehen werden, sondern sind, wie es für den Nerve growth factor Rezeptor, das Melanotransferrin und den Transferrin-Rezeptor gezeigt werden konnte, mit Zellproliferation und Aktivierung assoziiert (Herlyn et al., 1984; Holzmann et al., 1985). Zu den bis heute beschriebenen Ausnahmen zählen die monoklonalen Antikörper (MoAk) PAL M1, P3.58 und 15.75, die mit Melanom jedoch nicht mit benignen Nävi reagieren. Von benignen Nävi und dysplastischen Nävi aber nicht von Melanomen werden das TNKH-1 Antigen und das Adenosin deaminase Bindungsprotein exprimiert. Veränderungen im Phänotyp einer Tumorzelle sind somit nicht nur durch den Erwerb, sondern auch durch den Verlust von Molekülen gekennzeichnet. Mit monoklonalen Antikörpern, die in der Lage sind zwischen Nävus und Melanom zu unterscheiden, war es möglich, fünf stufenweise ablaufende Veränderungen im Antigenmuster während der Tumorprogression nachzuweisen (Holzmann et al., 1987). Nävuszell Nävi sind gegenüber den Hautmelanozyten durch Expression der Aktivierungsantigene Melanotransferrin und Transferrin-Rezeptor und des Chondroitinsulfat Proteoglykan Komplex gekennzeichnet. Hyperplasie und Zellatypie, wie sie in dysplastischen Nävi auftreten, sind mit der Expression von MUC54 und A-1-43 assoziiert. Der statistisch signifikante Anstieg der PAL-M1 Expression und der Verlust der Antigene TNKH-1 und Adenosin Bindungsprotein sind charakteristisch für das dünne Melanom. Marker der frühen Tumorprogression sind MUC18 und p3.58, während das Auftreten von HLA-DR Antigenen typisch für ein spätes Melanomstadium ist. Metastasen weisen häufig einen Verlust an Antigenexpression auf, der besonders bei den Antigenen K-1-2 und MUC54 auffällt. Interessanterweise gehen diese genannten Veränderungen im Antigenmuster parallel zu histologisch und klinisch erkennbaren Veränderungen des Melanoms, sodaß möglicherweise eine Beziehung zwischen der Expression dieser Antigene und bestimmter im Verlauf der Tumorprogression erworbener Fähigkeiten besteht (Abbildung 2).

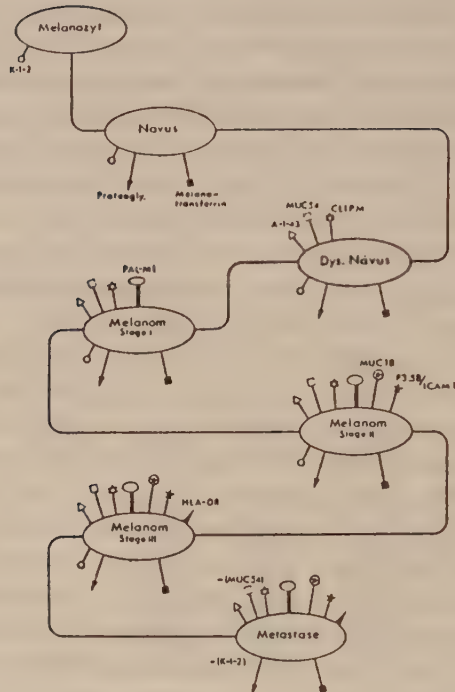


Abbildung 2: Modell der Tumorentstehung und Progression des malignen Melanoms. Die verschiedenen Stadien melanozytärer Gewebsveränderungen weisen Unterschiede im Antigen-Phänotyp auf. Mittels der Antigenexpression lassen sich die Gewebsveränderungen so zueinander in Beziehung setzen, daß ein Modell der schrittweisen Entwicklung der Melanommetastase aus einem Melanozyten entsteht.

Die Aufklärung der Molekularstruktur hat für einige dieser Antigene bereits zu einer konkreten Vorstellung über ihre mögliche Funktionsweise im Verlauf der Tumorentstehung und Progression geführt. So kommen sowohl dem Gangliosid GD3 (Cheresh et al., 1986) als auch dem Chondroitinsulfat Proteoglykan Komplex (de Vries et al., 1986) eine Funktion in der Zell-Zell und Zell-Substrat Interaktion zu. Die Expression von HLA-DR auf

Tumorzellen führt vermutlich zu einer verminderten Erkennung durch das Immunsystem (Fossati et al.,1984). Durch cDNA Klonierung und -Sequenzvergleich (Johnson et al.,1989) konnte gezeigt werden, daß das P3.58 Antigen identisch mit dem als ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) bezeichneten Molekül ist (Simmons et al.,1988; Staunton et al.,1988). Da ICAM-1 einer der Liganden des von hämatopoetischen Zellen exprimierten LFA-1 (lymphocyte function associated molecule) ist (Marlin and Springer,1987; Sanchez-Madrid et al.,1983), läßt sich vermuten, daß es zu einer Interaktion von ICAM-1 positiven Melanomzellen mit hämatopoetischen Zellen des Tumordinfiltrates kommt. Dadurch würden sich homotypische Adhäsionskräfte zugunsten heterotypischer Kräfte zu solchen Zellen verringern, die sich in ständiger Zirkulation befinden. Einzelne Tumorzellen könnten somit durch ICAM-1 Expression die Fähigkeit erhalten, sich aus dem Zellverband des Primärtumors zu lösen (Johnson et al.,1988).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden zwei bisher nicht bekannte Moleküle MUC18 und MUC54 vorgestellt, die Veränderungen im Phänotyp einer Melanomzelle während der Tumorprogression auf molekularer Ebene beschreiben. Die Expression des MUC54 Antigens in der Melanozyten Linie zeigt eine Assoziation mit Hyperplasie und/oder Zellatypie. MUC18 Antigenexpression scheint dagegen mit der Tumorprogression im Melanom zu korrelieren. Durch Verwendung einer Mischung aus fünf MoAk, die gegen das denaturierte MUC18 Glykoprotein induziert wurden, konnten MUC18 cDNA Klone aus einer humanen Melanom Expressions-Genbank isoliert werden. Die erhaltene Aminosäuresequenz zeigt Sequenzähnlichkeit zu Mitgliedern der Immunglobulin Supergenfamilie (Williams and Barclay,1988). Besonders ausgeprägt ist diese Sequenzähnlichkeit zum neuronalen Adhäsionsmolekül L1, zum Myelin associated glycoprotein (MAG,Salzer et al.,1987), zum Carcinoembryonic antigen (CEA,Oikawa et al.,1987) und zum Neural adhesion molecule (NCAM,Cunningham et al.,1987). Nachdem sowohl NCAM als auch MAG eine Funktion als interzelluläre Adhäsionsmoleküle in der Gewebsformation des Nervensystems haben (Cunningham et al.,1987; Poltorak et al.,1987), besteht

die Möglichkeit, daß der Expression des MUC18 Glykoproteins eine vergleichbare Funktion zukommt. MUC18 positive Melanomzellen sollten dementsprechend mit einer Adhäsionsfähigkeit ausgestattet sein, die bei der Metastasierung eine noch näher zu untersuchende Rolle spielt.

Material und Methoden

Antikörper, Gewebe und Zelllinien

Antikörper: Zur Abklärung von Antikörperreaktionen in der immunhistochemischen Analyse von Gefrierschnitten wurden folgende Maus MoAk verwendet: MoAk 225.28S (IgG1), gerichtet gegen das Chondroitinsulfat Proteoglykan (Wilson et al.,1981), wurde freundlicherweise von Dr.S.Ferrone, Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College, Valhalla,NY,USA zur Verfügung gestellt, MoAk 141.11 (IgM), der Maus H2-K^b,K^k,D^k Antigene erkennt, wurde freundlicherweise von G. Hämmerling, Deutsches Krebszentrum, Heidelberg erhalten. Die Hybridome, die folgende MoAk sezernieren, wurden über American Type Culture Collection (ATCC), Rockville,MD,USA, bezogen: MoAk Gap8.3 (IgG2a), gerichtet gegen das 'common leucocyte antigen' CD45 (Omary et al.,1980), MoAk W6/32 (IgG2a), gerichtet gegen HLA-A,B,C (Barnstable et al.,1978) und MoAk L243 (IgG2a), gerichtet gegen HLA-DR (Lampson and Levy,1980). Das Myelomprotein UPC10 (IgG2a) wurde bei Sigma, St.Louis,MO,USA gekauft.

Gewebe: Repräsentative Gewebeproben, erhalten von den Universitäts-Hautkliniken München und Hamburg und den Universitätskliniken Großhadern und Augsburg, wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zelllinien: Die verwendeten Zelllinien sind durch Austausch erhalten, über ATCC bezogen oder im Labor Dr. J.P.Johnson etabliert worden und wurden in mit 1mM Natriumpyruvat und 5-10% fötalem Kälberserum (Gibco, New York, USA) ergänztem RPMI 1640-Medium (Biochrom, Berlin) gehalten.

Melanom	Mel Ho, Mel Im, MelJu, Mel JuSo, Mel Wei Sk Mel1, Sk Mel25, Sk Mel28 IgR3, Parl, A375, B16F1 (Maus)
Kolon Karzinom	DLD1, HT29, LoVo, LS180, WiDr
Mamma Karzinom	MDAM, BT20, SkBr3
Gliom	N18, N59, N63, N64
Neuroblastom	Sk-N-MC, Sk-N-SH
Zervikal Karzinom	HeLa
Burkitt's Lymphom	Daudi, Raji, Ramos
T-Zell Leukemie	CEM, Jurkat, Molt4
Myeloide Leukemie	HL60, K652, U937
Fibroblasten	HF
(SV40 transformiert) SV40 HF, GM637, COS-7 (Affe)	
Epstein-Barr Virus	Ho B, JuSo B, Weiß B, Lea M, Lea Vater
transformierte	Lei Iri, Lei Mon, BAC, LAM, SCL, EMJ,
B-Lymphoblastoide	COX, Wal Vater, Schwa El, SHU, Jag Co
Zelllinien	

Zellfusion

Die MoAk MUC18 (IgG2a), MUC54 (IgM) und die Blotting Antikörper MUCBA18.1-18.5 (alle IgG1) wurden durch Fusion von P3x63Ag8.653 Maus Myelomzellen mit Milzzellen von weiblichen C57BL/6xBALB/c Fl Mäusen unter Verwendung des allgemein üblichen Verfahrens hergestellt (Galfre et al. 1977).

Immunisierung: Im Fall des MoAk MUC18 wurde die Milz drei Tage nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion mit einer angereicherten Membranpräparation (entsprechend 1mg Protein) einer Melanom Lymphknoten-metastase entnommen. Als Adjuvans wurden 1×10^9 Keime *Bordetella pertussis* gegeben (Behringwerke, Marburg).

Zur Gewinnung der Zellmembranen, wurde Gewebe unter flüssigem Stickstoff

mechanisch zerkleinert, in einer 0,25 M Saccharoselösung, die zur Inhibition von Proteasen 2 mM Benzamidinhydrochlorid (Sigma); 2 mM Phenyl methylsulfonylfluorid (Sigma) und 200 Einheiten Trasylol (Bayer AG, Leverkusen) enthielt, suspendiert, auf ein 1,6 M Saccharosekissen gegeben und bei 100.000xg für 3 Stunden zentrifugiert. Die Zellmembranbruchstücke reichern sich dabei in der Interphase an und wurden so für die Immunisierung verwendet.

Der MoAk MUC54 wurde aus einer Maus erhalten, der erst 100mg Lipid A (Raeffner-Cavaillon et al., 1985) und 14 Tage später je 3×10^5 Zellen Mel Juso, Mel Ho und Mel Wei zusammen mit 1×10^9 Keimen *Bordetella pertussis* intraperitoneal injiziert wurden. Das Lipid A wurde uns freundlicherweise von Dr. Galanos (Max Planck Institut für Immunbiologie, Freiburg) überlassen.

Die Blotting Antikörper MUCBA18.1-18.5 sollten definitionsgemäß gegen das denaturierte MUC18 Antigen gerichtet sein. Die Immunisierungsprozedur begann mit der Injektion von 100mg Lipid A. 10 Tage später folgte die Immunisierung mit hitzedenaturiertem Immunpräzipitat (siehe dazu Kapitel Immunpräzipitation) des aus 1×10^9 Mel Juso Zellen gewonnenen MUC18 Antigens. Die Injektion enthielt darüber hinaus 0,1% Natriumlaurylsulfat und komplettes Freund's Adjuvans (Difco, Detroit, USA). Die Immunisierung wurde im Abstand von 14 und weiteren 20 Tagen wiederholt. Die letzte Injektion enthielt als Adjuvans 1×10^9 Keime *Bordetella pertussis*.

Zellfusion: Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Milz steril entnommen und in 1ml Gewebekulturmedium mit einem Pistill zur Einzelzellsuspension zerkleinert. Ein Drittel der Milzzellen wurde für die Zellfusion weiterverarbeitet, der Rest eingefroren. Milzzellen und P3x63Ag8.653 Maus Myelomzellen wurden je zweimal in serumfreien Dulbecco's modified Eagle's Medium (DME-Medium, Gibco, Paisly, Schottland) gewaschen, im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und zentrifugiert (350xg, 10 Min). Danach wurden dem Zellpellet 0,7ml auf 37°C erwärmte PEG 6000 Lösung innerhalb einer Minute kräftig untergerührt. Nach anschließender Zentrifugation der Zellen für 1 Minute bei 500xg wurde langsam (5ml/Min) mit DME-Medium das Polyethylenglykol herausverdünnt. Die Zellen wurden nochmals mit DME-Medium gewaschen, in HAT Selektionsmedium (4×10^{-4} M Hypoxanthin, 8×10^{-6} M Aminopterin und $6,4 \times 10^{-5}$ M Thymidin) aufgenommen und in 96-Loch Microtiterplatten (Falcon, Cockeysville, USA)

verteilt. Als Feeder-Zellen dienten 2×10^4 Maus Peritonealzellen pro Loch. Zur Klonierung der selektionierten Hybridome wurde mindestens zweimal das Grenzverdünnungsverfahren mit weniger als 1.0 Zellen pro Loch angewendet.

PEG 6000 Lösung: 1g Polyethylenglykol (Merck, Darmstadt)

1ml DME-Medium unter aufkochen lösen

Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper

Die Isotypenbestimmung monoklonaler Antikörper erfolgte mittels Immundiffusion nach Ouchterlony (Ouchterlony, 1970). Dazu wurden 1g Agarose und 3g Polyethylenglykol 6000 in 100ml Phosphatpuffer pH 7,0 unter Erhitzen gelöst und in 35x10mm Petrischalen (Falcon) gefüllt. Nach Erkalten des Gels wurden in einem Abstand von 1cm Vertiefungen ausgestanzt und mit jeweils 3ul 20-fach konzentriertem Hybridomüberstand oder isotypenspezifischen Kaninchenantisera gegen Maus Immunglobuline (Bionetics Laboratory Products Division, Charlston, USA) gefüllt. Nach Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer wurden die Ergebnisse im Durchlicht ausgewertet.

Phosphatpuffer: 26mM Natriumdihydrogenphosphat

40mM Dinatriumhydrogenphosphat

5mM EDTA

Immunhistochemie

Gefrierschnitte von 6µm Dicke wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und, falls nicht am selben Tag weiterverwendet, bei -70°C gelagert. Die Schnitte wurden 10 Minuten in Azeton fixiert, bevor mit

unverdünntem Hybridomüberstand oder entsprechend verdünntem Antikörper in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert wurde. Anschließend wurde mit PBS gespült und für eine weitere Stunde mit einem 1:200 in PBS mit 10% foetalem Kälberserum verdünnten, affinitätsgereinigtem, peroxidase-konjugiertem Kaninchenantiserum gegen Mausimmunglobuline (Dianova, Hamburg) inkubiert. Nach dreimaligen waschen mit PBS färbt man für 7-8 Minuten bei 37°C. Als Substrat wurde dazu eine Lösung aus 0.24mg/ml 3-Amino-9-ethylcarbazol (Sigma) und 0.003% H₂O₂ in einem 0.1M Azetatpuffer pH4,9, verwendet. Das Carbazol wurde vorher bei einer Konzentration von 5mg/ml in N'N Dimethylformamid (Sigma) gelöst. Nach Beendigung der Farbreaktion wurden die Schnitte mit Mayer's Hemalaun eine Minute lang gegengefärbt und mit Kaiser's Glyceringelatine (Merck) eingedeckt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde der Prozentsatz angefärbter Zellen geschätzt, wobei als negativ nur solche Gewebe bewertet wurden, in denen keine gefärbte Zelle entdeckt werden konnte.

Die MoAk 141.11 (IgM) und UPC10 (IgG2a) dienten als Isotypkontrollen, der MoAk 225.28S als konstitutiver Marker für die Melanozyten der Nāvi und Melanome, MoAk Gap8.3 und L243 zum Nachweis von infiltrierenden Lymphozyten und der MoAk W6/32 als Positivkontrolle.

Azetatpuffer pH4,9: 50mM Essigsäure

50mM Natriumazetat

Anfertigung von Zytospin Präperaten

Durch Zentrifugation in einer Cytospin Zentrifuge (Shandon Southern, Runcorn, England) bei 100 xg für 8 Minuten wurden Zellen in einem Volumen von 100µl bei einer Konzentration von 3-5x10⁵ Zellen/ml auf einen Objektträger gebracht. Die weitere Behandlung der Zytospin Präparate bezüglich Trocknung und Fixierung entspricht der von Gewebeschnitten.

Immunfluoreszenz

1x10⁶ unfixierte Zellen wurden mit 50µl unverdünntem Hybridomüberstand oder entsprechend verdünntem Antikörper bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurde für 20 Minuten mit einem 1:20 in PBS mit 2,5% foetalem Kälberserum verdünntem, Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) konjugiertem Ziegenantiserum gegen Mausimmunglobuline (Medac, Hamburg) bei 4°C unter Lichtabschluß inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Zellen erfolgte die Auswertung der Ergebnisse mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Leitz, Wetzlar) oder eines FAC Scan (Flourescence activated cell scanner, Bencton & Dickenson).

Immunpräzipitation

Proteine der Zelloberfläche wurden extern mit ¹²⁵Jod unter Verwendung der Glucoseoxidase - Lactoperoxidase Methode (Pink and Ziegler, 1979) zu einer Aktivität von 5-15cpm/Zelle markiert. Dazu wurden 5x10⁷ Zellen in 0.5 ml PBS suspendiert und 10µl 1mM Kaliumjodid, 100µl 50mM β-D-(+)-Glucose (Sigma), 50 Einheiten Lactoperoxidase (Sigma) und 1mCi Na¹²⁵I (NEN, Dreieich) zugegeben und die Reaktion mit 4 Einheiten Glucoseoxidase (Typ 4, Sigma) gestartet. Nicht gebundenes Jod wurde nach 20 Minuten mit PBS ausgewaschen.

Zur biosynthetischen Markierung mit radioaktiven Methionin wurden 5x10⁶ Zellen für eine Stunde in methioninfreiem Medium (Gibco) gehalten, das anschließend mit 50µCi/ml [³⁵S] L-Methionin (spezifische Aktivität 800Ci/mmol, Amersham Buchler, Braunschweig) ergänzt wurde. Die Inkubationszeit betrug dabei vier Stunden.

Die besten Präzipitationen erhielt man, wenn zur Zellyse im Fall des MoAk MUC18 1% Triton X-100 (Sigma) und für den MoAk MUC54 1% Taurocholsäure (Sigma) als Detergenz verwendet wurde. Zur Inhibition von Proteasen wurden dem Lysepuffer 2mM Benzamidinhydrochlorid, 2mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 200 Einheiten Trasylol zugesetzt. Die Kerne

wurden abzentrifugiert und das Lysat durch wiederholte Inkubation mit Sepharose CL-4b (Pharmacia, Uppsala, Schweden), die mit Pferdeserum (Gibco) gesättigt war, von unspezifischer Bindung befreit. Die Immunmatrix, hergestellt durch Bindung von 15ml Hybridomüberstand an 30µl gequollene Protein A Sepharose (Sigma), wurde dem Zellysat für drei Stunden bei 4°C zugegeben. Für IgM und IgG1 Antikörper wurde die Immunmatrix mit 100µg affinitätsgereinigtem Kaninchenantiserum gegen Mausimmunglobuline (Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark) vorinkubiert. Die gebundenen Immunkomplexe wurden durch Kochen in 50µl SDS-Probenpuffer eluiert und in einem 7,5% SDS Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken wurde dem SDS-Probenpuffer entweder 10% 2-Mercaptoethanol oder 10µl 500mM Dithiothreitol (Sigma) zugegeben. Überschüssiges Dithiothreitol wurde nach 5 Minuten durch Zugabe von 10µl 500mM Jodacetamid abgefangen. Fixierte, Coomassie-gefärbte und getrocknete Gele wurden auf einem Kodak XAR-5 Film mit Verstärkerfolie bei -70°C exponiert. Die Molekulargewichtsmarker wurden von Amersham Buchler bezogen.

Lysepuffer: 20mM Tris-HCL, pH7,4
 125mM Natriumchlorid
 1mM Kalziumchlorid
 1mM Magnesiumchlorid

SDS-Probenpuffer: 4,0ml 10% Natriumlaurylsulfat Lösung
 2,5ml 0,5M Tris-HCL, pH6,8
 2,0ml Glycerin
 einige Körner Bromphenolblau

Neuraminidaseverdau des Immunpräzipitats

Der Neuraminidaseverdau des Immunpräzipitats wurde gemäß eines von Brown et al. (1981) beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Das von unspezifischen Bindungen befreite Immunpräzipitat wurde für drei Stunden bei 37°C

mit 0.5 Einheiten *Clostridium perfringens* Neuraminidase (Typ VI, Sigma) inkubiert.

Glycopeptidase-F Verdau des Immunpräzipitates

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes des MUC18 ohne N-Linked Zuckerketten wurde das von unspezifischen Bindungen befreite Immunpräzipitat in 50µl Reaktionspuffer für 5 Minuten gekocht und über Nacht bei 37°C mit 3 Einheiten Glycopeptidase-F (Boehringer, Mannheim) behandelt. Glycopeptidase-F spaltet durch Hydrolyse an Asparagin gebundene Zuckerketten (N-Linked Zucker).

Reaktionspuffer: 100mM Tris-HCL, pH8,3

50mM Magnesiumchlorid

0,5% Triton X-100

0,5% 2-Mercaptoethanol

2mM Benzamidinhydrochlorid

2mM Phenylmethylsulfonylflourid

200U Trasylol

Natriumlaurylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen wurden entsprechend der von U.K.Laemmli (1970) beschriebenen Methode folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

ml entsprechend	30% Polyacrylamid Stammlösung
der Konzentration	
8,75 ml	1,5M Tris-HCL, pH 8,8
ad 34,5 ml	Aqua dest.
400 µl	10% Natriumlaurylsulfat Lösung
20µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Biorad, Richmond, USA)
100µl	10% Ammoniumperoxodisulfat Lösung

zwischen zwei Glasplatten (Abstand 1,5mm) gegossen und mit einer 0,1%igen Natriumlaurylsulfat-Lösung überschichtet. Nach unter Luftabschluß erfolgter Polymerisation wurde ein Sammelgel mit folgender Zusammensetzung darüber geschichtet:

1,0 ml	30% Polyacrylamid-Stammlösung
2,5 ml	0,5M Tris-HCL, pH6,8
6,5 ml	Aqua dest.
100 µl	10% Natriumlaurylsulfat Lösung
5 µl	TEMED
100 µl	10% Ammoniumperoxodisulfat Lösung

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über Nacht bei einer Stromspannung von 50-75 Volt.

30% Polyacrylamid Stammlösung:

30% Polyacrylamid (Biorad)
0,8% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid (Biorad)

Laufpuffer: 383mM Glycin
50mM Tris
0,1% Natriumlaurylsulfat

Western blotting

Immunpräzipitate wurden aus Zelllysaten hergestellt, in einem 7.5% SDS Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und entsprechend dem von Towbin und Gordon (1979) beschriebenen Verfahren elektrophoretisch auf 0,45µm Nitrozellulose Membranfilter (#BA85, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Zur Durchführung dieses als Western blotting bezeichneten Transfers von Proteinen wurde folgende Apperatur aufgebaut, indem übereinander geschichtet wurden:

- # 1 Kohleelektrode (Kathode)
- # ein mit Blotting Puffer getränkter Schwamm
- # Whatman 3MM Papier (Schleicher & Schüll)
- # SDS-Polyacrylamid Gel
- # Nitrozellulose Membranfilter
- # Whatman 3MM Papier
- # ein mit Blotting Puffer getränkter Schwamm
- # 1 Kohleelektrode (Anode)
- # 2kg Gewicht

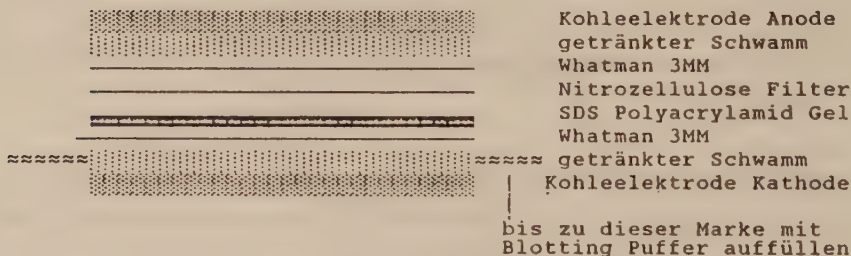


Abbildung zeigt den apperativen Aufbau des Western blottings

Die Zahl der zur Herstellung des Immunpräzipitates lysierten Zellen richtete sich nach der Breite des zu blottenden Gels, und betrug für Mel Juso 3×10^8 Zellen/cm und im Fall der glatten Muskulatur des Magenkarzinoms 0.3g homogenisiertes Gewebe/cm. Zur Entwicklung wurde die Nitrozellulosemembran anschließend in einer feuchten Kammer für eine Stunde mit unverdünntem Hybridomüberstand inkubiert. Daran schloß sich nach 3 mal 5 minütigem Waschen mit PBS 0.05% Tween (Sigma) die Inkubation mit einem 1:100 in PBS mit 10% foetalem Kälberserum verdünnten, peroxidase gekoppelten Kanin-

chenantiserum gegen Mausimmunglobuline (Dakopatts) an. Gebundener Antikörper wurde durch Zugabe der Substratlösung sichtbar gemacht.

Substratlösung: 1,26 mM o-Dianisidin dihydrochlorid (Sigma)

15,3 mM Natriumnitroprussid (Sigma)

0,007% H_2O_2

Blotting Puffer: 383mM Glycin

50mM Tris

15% Methanol

**Synthese und Klonierung doppelsträngiger cDNS in den
Expressionsvektoren Lambda gt11 und Lambda zap**

Der Zustand der zur cDNS-Synthese eingesetzten RNS ist von entscheidender Bedeutung für die spätere Qualität, und somit für die Sequenzinformation der resultierenden cDNS. Daher ist peinlichst genau darauf zu achten, daß alle verwendeten Reagenzien und Plastikwaren frei von RNase-Kontamination sind, und daß es zu keiner Degradation durch die bei der Zellyse freigesetzten endogenen RNasen kommt.

mRNS Isolierung: 2.5×10^8 Mycoplasma freie Mel Juso Zellen - 24 Stunden mit 50 Einheiten/ml Interferon-gamma stimuliert, wodurch die Expression von P3.58, einem weiteren Antigen, das aus dieser Genbank ebenfalls kloniert werden soll, verstärkt wird (Holzmann et al., 1987; Johnson et al., 1988) - wurden mit einer Lösung aus 4M Guanidinisothiocyanant (RNA grade, BRL, Bethesda, USA), 25mM Natriumazetat, 0.5% Natriumlaurylsarcosin (Sigma) und 0.1M 2-Mercaptoethanol (erst kurz vor Gebrauch zugeben) für zwei Stunden bei Raumtemperatur lysiert. Freigesetzte RNS wurde durch Zentrifugation bei $130.000 \times g$ durch ein 5,7 molares Cäsiumchloridkissen (Chirgwin et al., 1979, BRL, RNA grade) isoliert. Anschließend wurde poly(A)⁺RNS aus der total-RNS durch Affinitätschromatographie mittels oligo(dt)-cellulose selektioniert (Avin and Leder, 1972).

Dazu wurde die poly(A)*RNS bei hoher Salzkonzentration (500mM Lithiumchlorid, 10mM Tris-HCL, pH 7,5; 0.1% Natriumlaurylsulfat) an oligo(dt)cellulose (Typ 3, BRL) gebunden und anschließend mit sterilem, destilliertem Wasser eluiert.

cDNS Synthese: Zur cDNS Synthese wurde das von der Firma BRL angebotene cDNS-Synthese-System verwendet. Nach dem vom Hersteller gemachten Angaben wurde wie folgt verfahren.

Zur Synthese des ersten cDNS-Stranges wurden 10µg poly(A)*RNS eingesetzt und folgende Reagenzien zugegeben:

10µl	5-fach Erststrangpuffer (250mM Tris-HCL pH8,3, 3.75mM Kaliumchlorid, 15mM Magnesiumchlorid, 50mM Dithiothreitol)
2,5µl	Mischung der NTP's mit einer jeweiligen Konzentration von 10mM
5,0µl	oligo(dt) ₁₂₋₁₈ (0,5mg/ml)
500Einheiten	klonierte M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase

Der Reaktionsansatz wurde mit sterilem, destilliertem Wasser auf ein Volumen von 50µl aufgefüllt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Die Synthese des zweiten Stranges erfolgte nach einem leicht modifizierten von Gubler und Hoffmann (1983) entwickelten Verfahren. Hierbei wird die Eigenschaft der RNase H ausgenutzt, die unter den gewählten Bedingungen einige meist 5'gelegenen RNS oligomere des RNS:cDNS Hybrids bestehen läßt. Diese lassen sich direkt als Primer für die Synthese des zweiten Stranges mit *E.coli* DNS-Polymerase verwenden. Dadurch entfällt der S1-Nuklease-Verdau, wie er bei der HAIRPIN-LOOP geprimten Synthese des zweiten Stranges nötig ist.

Zur Synthese des zweiten Stranges wurden folgende Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge zugegeben:

289,5µl	steriles, destilliertes Wasser
7,5µl	Mischung der NTP's mit einer jeweiligen Konzentration von 10mM
40,0µl	10-fach Zweitstrangpuffer (188mM Tris-HCL, pH8,3, 906mM Kaliumchlorid, 46mM Magnesium- chlorid, 37.5mM Dithiothreitol)
10,0µl	<i>E.Coli</i> DNA Polymerase I (10 Einheiten/µl)
1,75µl	<i>E.Coli</i> RNase H (2 Einheiten/µl)

Nach einer Inkubation für zwei Stunden bei 16°C wurde mit Phenol extrahiert und die cDNS mit Ethanol präzipitiert.

Da die cDNS-Klonierung in der EcoRI Schnittstelle eines *Lambda* Expressionsvektors erfolgen sollte, mußten folgendende Reaktionschritte durchgeführt werden, damit synthetische EcoRI Linker an die cDNS legiert werden können.

EcoRI Methylierung: Die EcoRI Methylierung schützt die cDNS vor dem Restriktionsverdau (Greene et al.,1975), wenn mit der Restriktiosendonuclease EcoRI aus dem synthetischen Linker überlappende Enden hergestellt werden. Dazu wurde das Pellet in 40µl EcoRI Methylierungspuffer gelöst, 10 Einheiten EcoRI Methylase (BRL) zugegeben und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Zur Inaktivierung der Methylase wurde darauf 10 Minuten lang auf 70°C erhitzt.

EcoRI Methylierungspuffer:

50mM	Tris-HCL, pH7,5
1mM	EDTA
5mM	Dithiothreitol
80µM	S-Adenosyl L-Methionin (Biolabs Beverly, USA, erst kurz vor Gebrauch zugeben)

Fill in Reaktion mit dem Klenow Fragment: Diese Reaktion wurde durchgeführt, um die Zahl der glattendigen DNS Moleküle zu erhöhen und somit eine größere Ausbeute an mit EcoRI Linkern legierter cDNS zu erzielen.

Zu der methylierten cDNS wurden 40µl 5-fach Zweitstrangpuffer zugegeben und mit sterilem, destilliertem Wasser auf 200µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 Einheiten Klenow-Fragment (BRL) inkubiert man die Reaktion bei 42°C 30 Minuten lang, phenolisiert und präzipitiert anschließend mit Ethanol.

Zweitstrangpuffer: 100mM Tris-HCL, pH7,5
 25mM Magnesiumchlorid
 50mM Ammoniumsulfat
 500mM Kaliumchlorid
 250µg/L bovines Serumalbumin
 50mM Dithiothreitol
 je 50µM dNTP's (Böhringer, Mannheim)

Anbau von synthetischen EcoRI Linkern an die cDNS: Das Pellet wurde im Ligationspuffer gelöst und 0.5µl synthetische EcoRI Linker (1mg/ml, Biochemicals Inc., Milwaukee, USA) sowie 2.0µl T4 DNS Ligase (BRL) und 2.0µl steriles, destilliertes Wasser wurden zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 15°C inkubiert und durch zehnminütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Anschließend wurden wie unter Restriktionverdau mit 10 Einheiten EcoRI geschnitten.

10-fach Ligationspuffer: 300mM Tris-HCL pH7,8
 100mM Magnesiumchlorid
 100mM Dithiothreitol
 4mM ATP (Böhringer)

Größenselektionierung der cDNS und Abtrennen nicht legierter EcoRI Linker: Zur Größenselektionierung und Reinigung der cDNS von nicht legierten Linkern wurde die cDNS über ein 1.5% Agarose Gel (Sea Kem GTG Agarose, FMC Corp. Hameln) aufgetrennt. cDNS einer Größe von 1600-8000 Basenpaaren wurde unter Verwendung einer Elutionskammer (ISCO, Lincoln, USA) durch Elektroelution (100 Volt für 3 Stunden) aus dem entsprechenden Agarosestück herausgelöst und anschließend mit Ethanol präzipitiert.

Ligation der cDNS mit EcoRI geschüttener Lambda gt11 und Lambda zap DNS: Entscheidend für die Ausbeute an legierter cDNS ist das äquimolare Verhältnis von cDNS zu Vektor. Für die Ligrationsreaktion wurden 156µg cDNS in 0,5µl Ligationspuffer gelöst, 1 µl Lambda DNS (1mg/ml Stratagene, San Diego, USA) sowie 0,5µl T4 DNS Ligase und 3,0µl steriles destilliertes Wasser zugegeben. Inkubiert wurde über Nacht bei 15°C (Maniatis et al., 1982).

In vitro Packaging: Der zur in vitro Verpackung der Lambda DNS in Phagenpartikel verwendete Gigapack plus (Stratagene, San Diego, USA) besteht aus zwei Komponenten, dem sonic Extrakt, der die leeren Phagenköpfe und -Schwänze enthält und dem freeze/thaw Extrakt, der die für die DNS-Verpackung benötigten Enzyme und ATP enthält. Entsprechend der vom Hersteller gemachten Angaben wurden beide Teile schnell aufgetaut, die Phagen-DNS zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500µl Phagenverdünnungspuffer und 20µl Chloroform zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen lagert man die Lösung bis zur weiteren Verwendung bei 4°C.

Phagenverdünnungspuffer: pro Liter 5,8g Natriumchlorid

2g Magnesiumsulfat

50ml 1M Tris-HCL, pH7,5

5ml 2% Gelatine

Ausplattieren der Genbank: Das für den jeweiligen Bacteriophagen geeignete Wirtsbakterium (E.coli Y1090 für Lambda gt11 und E.coli BB4 für Lambda zap Bakteriophagen) wurde ausgehend von einer einzelnen Kolonie über Nacht unter starkem Schütteln (190rpm/Min) bei 37°C gezüchtet. Als Nährmedium wurden 50ml LB Medium, ergänzt durch 0,2% Maltose und 10mM Magnesiumsulfat, verwendet. Nach Zentrifugation wurde das Pellet im 0.4 fachen des vorherigen Volumens 10mM Magnesiumsulfat resuspendiert.

Bevor die Genbank auf LB (Luria Bertani) Agarplatten ausplattiert wurde, wurde mit 20.000-30.000 p.f.u./150mm Petrischale (Falcon) die geeignete Verdünnung der Phagen in 300µl Phagenverdünnungspuffer mit 300µl des entsprechenden Wirtsbakteriums für 20 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Dadurch können sich die Phagen an die Zellen heften, bevor 6ml

Top-Agar zugegeben und die Genbank ausplattiert wurde. Die Platten der Lambda gtl1 Genbank wurden 3-4 Stunden bei 37°C vorinkubiert, während die Inkubation der Lambda zap Genbank aufgrund des langsameren Wachstums der E.coli BB4 Zellen über Nacht erfolgte.

Das Chromosom des Bakteriophagen Lambda ist ein lineares DNS-Molekül, dessen zentrale Region keine essentiellen Gene enthält und daher gegen exogene DNS-Fragmente ausgetauscht werden kann. Der Vorteil bei der Verwendung von Lambda als Klonierungsvektor liegt darin, daß die rekombinierte Phagen-DNS in vitro in Phagenköpfe verpackt mit hoher Effizienz in Bakterien transfiziert werden kann. Da sowohl bei Lambda gtl1 als auch bei Lambda zap der Einbau der fremden DNS in das für β -galaktosidase kodierende Gen erfolgt, kann das von diesen Vektoren exprimierte Fusionsprotein mit Antikörperproben gescreent werden.

Der strukturelle Unterschied zwischen Lambda gtl1 und Lambda zap liegt zum einen darin, daß Lambda zap eine multiple Klonierungsstelle enthält, und zum anderen darin, daß sich in lambda zap 5' und 3' von der Klonierungsstelle Plasmidsequenzen befinden, die mit Unterstützung des kotransfizierten F1 Helferphagen automatisch ausgeschnitten und in das Phagemid pBluescript SK(M13-) umkloniert werden können. Dieser Vorgang basiert darauf, daß 'Helfer'-Proteine (d.h. Proteine vom F1 Phagen) Nicks am 5' von der Klonierungsstelle gelegenen Origin of Replikation initiieren, von denen die DNS-Synthese ausgeht, und solange voranschreitet bis sie zu dem 3' von der Klonierungsstelle gelegenen Abbruchsignal gelangt. Die so entstandene einzelsträngige DNS enthält alle nötigen Sequenzen des Phagemids pBluescript SK(M13-), einschließlich des Inserts, und wird vom Gen II Produkt des F1 Phagen zirkularisiert.

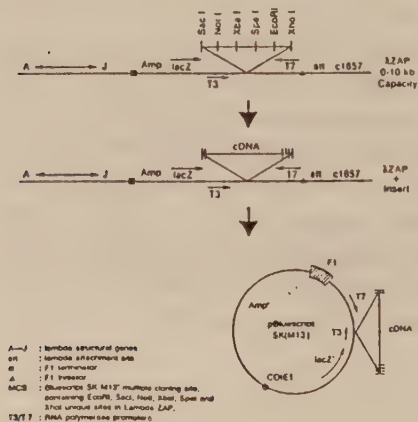


Abbildung: Schematische Darstellung des automatischen Ausschneideprozeß von pBluescript aus Lambda zap.

Immunoscreening der Lambda Genbanken

Sobald erste lytische Plaques zu sehen waren, wurden die Platten mit einem trockenen Nitrozellulose Filter (#BA85 Schleicher & Schuell) bedeckt, der vorher in 10mM Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG, Sigma) für die Lambda gtl1 und in 50mM IPTG für die Lambda zap Genbank getränkt worden ist. Da der Einbau der cDNAs in die EcoRI-Schnittstelle des lacZ Genes, das für die β -Galaktosidase kodiert, erfolgte, führte die Zugabe von IPTG zu einer Inaktivierung des lac Repressors und einer damit verbundenen Induktion der Synthese eines β -Galaktosidase-Fusionsprotein. Die höhere Konzentration an IPTG zur Induktion des Lambda zap Fusionsproduktes wird benötigt, da die E.coli BB4 Zellen in die zap transfiziert wurde in hoher Kopienzahl ein F'Episom enthalten, daß unter anderem für den durch alpha Komplementation wirksamen lac Repressor (lacI^{qZ}M15) kodiert.

Nach einer Inkubationszeit von 3,5 Stunden bei 37°C wurde der erste Filter entfernt und ein zweiter Filter (Replika) aufgelegt und für weitere 3,5 Stunden inkubiert.

Unspezifische Antikörperbindungen wurden mit einer 0,1% Gelatine/PBS Lösung geblockt. Hierin können die Filter wenn nötig auch für einige Tage bei 4°C gelagert werden.

Die Antikörperbindung und die Färbung der Filter erfolgte entsprechend dem von Young und Davis (1983) beschriebenen Verfahrens, wobei die Färbung den unter der Methode Western blotting gemachten Angaben entspricht. Als positive Signale wurden dabei nur solche gewertet, die kräftig und sich deckungsgleich sowohl auf dem Original als auch dem Replikafilter befanden. Der dem positiven Signal entsprechende lytische Plaque wurde ausgestanzt und in 500 μ l Phagenverdünnungspuffer mit 20 μ l Chloroform gegeben. Nach 4-6 Stunden sind die Phagen freigesetzt und können erneut ausgestrichen werden. Diese Prozedur wiederholte sich solange bis eine monoklonale Population vorlag.

Präparation von Phagen DNS

Phagen wurden bei einer Dichte von 10^6 p.f.u. pro 150mm Petrischale auf einem speziellen Phagenagar ausplattiert. Bei dieser Konzentration der Phagen kommt es zu einer Totallyse der Bakterien. Man gibt 10ml Phagen verdünnungspuffer auf die lysierten Bakterien und läßt für 2 Stunden bei Raumtempertur sanft schütteln. Anschließend wurde bei 1000xg zentrifugiert. Den Überstand gibt man in ein neues Gefäß, fügt RNase A und DNase I zu einer Endkonzentration von jeweils 1µg/ml zu und läßt für 30 Minuten bei 37°C inkubieren. Durch die Zugabe von Polyethylenglykol (0,6 Vol SM-PEG) und Stellen in ein Eisbad für 1 Stunde wurden die Phagenpartikel präzipitiert. Danach wurde bei 2800xg für 20 Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet sorgfältig in 500µl Phagenverdünnungspuffer resuspendiert. Zum Aufschluß der Phagenpartikel wurden 5µl 10% Natriumlaurylsulfat Lösung und 5µl 500mM EDTA pH8 zugegeben und für 15 Minuten bei 68°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde phenolisiert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol die Phagen DNS präzipitiert.

<u>Phagenagar:</u>	pro Liter	10g	Natriumchlorid
		10g	Bacto-Tryptone (Difco)
		5g	Hefeextrakt (Difco)
		15g	Low-EEO Agarose (Sigma)

SM-PEG: 20g Polyethylenglykol 6000
 8g Natriumchlorid
 ad 100ml Phagenverdünnungspuffer

Restriktion von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Zur Gewinnung von DNS Fragmenten wurde DNS mit einem geeigneten Restriktionsenzym der Firmen BRL oder Boehringer in dem vom Hersteller angebo-

tenem Restriktionspuffer und bei geeigneter Temperatur verdaut.

Exonuklease III verdau -Erase-a-Base™ System

Der von der Firma Promega (Madison, WI, USA) vertriebene Erase-a-Base™ Kit basiert auf der von Henikoff (1984) beschriebenen Methode. Entsprechend der vom Hersteller gemachten Angaben wurden 5-10 µg zirkuläre cDNS mit zwei geeigneten Restriktionsenzymen so verdaut, daß die für das anschließende Sequenzieren verwendete Primerbindungsstelle durch ein 3'-überhängendes Ende geschützt ist und sich ein 5'-überhängendes- oder glattes Ende in unmittelbarer Nachbarschaft zum Insert befindet. Von diesem Ende ausgehend schreitet die Deletion in Abhängigkeit zur Reaktionszeit und -temperatur voran. Gemäß der vom Hersteller gemachten Angaben wurde die cDNS im Exo III-Puffer gelöst und mit 400 Einheiten Exonuclease III bei 37°C verdaut. In Abständen von 30 Sekunden werden 2,5 µl dem Reaktionsansatz entnommen und zu 7,5 µl S1-mix gegeben und für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die S1 Nuklease durch Zugabe von 1 µl S1-Stoppuffer und Erhitzen für 5 Min auf 70°C inaktiviert. Nach Fill in Reaktion und Ringschluß durch Ligation wurden die Plasmide in kompetente Bakterien transformiert.

10x Exo III Puffer: 600mM Tris-HCL, pH 8,0
6,6mM Magnesiumchlorid

S1 Mix: 40mM Kaliumazetat, pH 4,6
337mM Natriumchlorid
1,35mM Zinksulfat
6,75% Glycerin

S1 Stoppuffer: 300mM Tris
50mM EDTA

Nuclease Bal31 Verdau

Die Nuclease Bal31 besitzt eine Exonuklease Aktivität für doppelsträngige linearisierte DNS, die zur schrittweisen Abspaltung von Mononukleotiden von den Enden her führt. Für die Reaktion wurden zusammenpipettiert:

5µg DNS
 45µl 5x Bal31 Puffer
 4U Bal31 Nuclease 'Fast' (840U/ml, IBI,Connecticut, USA)
 170µl Aqua dest.

und bei 37°C inkubiert. In Intervallen von 10 Minuten wurden jeweils 45µl entnommen, die Reaktion durch Zugabe von 5µl 200mM EDTA gestoppt und für 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Die so verkürzte cDNS wurde auf ein Agarose Gel aufgetragen, durch Elektroelution wiedergewonnen und in einen pUC Vektor einkloniert.

5x Reaktionspuffer: 100mM Tris-HCL, pH8,0

3M Natriumchlorid

62,5mM Magnesiumchlorid

62,5mM Kalziumchlorid

Oberführung von 3'Überhängenden Enden in glatte Enden

Die T4 DNS Polymerase besitzt eine hohe 3'Exonuklease Aktivität die zum Auffüllen von 3'überhängenden Enden ausgenutzt wird. Für die Reaktion wurden zu 1µg DNS pipettiert

2µl 10x T4 Polymerase Puffer

ad 19µl Aqua dest.

1µl Lösung aller 4 NTP's in einer Konzentration von 2mM

2,5U T4 DNS Polymerase (BRL)

und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 500mM EDTA gestoppt. Anschließend wurde phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert (Maniatis et al., 1982).

10x T4 Polymerase Puffer: 330mM Tris-azetat, pH7,9

660mM Kaliumazetat

100mM Magnesiumazetat

5mM Dithiothreitol

1mg/ml bovines Serumalbumin

Um- bzw. Subklonierung in pUC Plaswide

pUC Plaswide sind modifizierte pBR322 Vektoren, enthalten das Ampicillin Resistenzgen, die Polylinker Stelle des M13mp Vektors und das 5'-Ende des LacZ Genes, wodurch eine Farbselektion der Inserttragenden Plaswide möglich ist.

Zur Umklonierung wurde pUC18/pUC19 Plaswide (Pharmacia) verwendet, wobei wie folgt vorgegangen wurde.

Das pUC Plasmid linearisiert man durch Spaltung mit einem geeignetem Restriktionsenzym, das nur innerhalb der Polylinker Stelle schneidet und passende Schnittstellen für den Einbau des interessierenden Fragmentes liefert. Unter den bereits weiter oben beschriebenen Bedingungen wurden 20ng DNS mit 10ng linearisierter Plasmid DNS legiert. Die so erhaltenen

Plasmide wurden darauf in kompetent gemachte *E.coli* JM101 transformiert. Hierzu wurden 260µl Bakteriensuspension zu dem Ligationansatz gegeben, vorsichtig durchmischt und für 1 Stunde auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock für exakt 45 Sekunden bei 42°C gibt man 0,9 ml TYM-Medium zu und läßt für 1 Stunde bei 37°C stehen. Danach wurden die pelletierten Bakterien in 100µl TYM-Medium resuspendiert, auf einer LB-Platte (mit 10µg Ampicillin zur Selektion der transformierten Bakterien und 1mM IPTG sowie 40µg/ml X-GAL für die Farbreaktion) ausplattiert und in einen Brutschrank bei 37°C über Nacht gestellt.

TYM-Medium: 2% Bacto Trypton (Difco)
 0,5% Bacto Yeast Extrakt (Difco)
 100mM Natriumchlorid

TYM-Medium: TY-Medium mit 10mM Magnesiumchlorid

Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien zur DNS Transformation

Eine in LB Medium mit 2% Trypton gewachsene Übernachtskultur wurde 1:100 verdünnt und bis zu einer $OD_{220} = 0.6$ gezogen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation pelletiert und im gleichen Volumen eisgekühltem 50mM Kalziumchlorid resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Bakterien wurden nochmals zentrifugiert und im 0,1 Volumen 50mM Kalziumchlorid resuspendiert.

Mini-Präparation von Plasmid DNS -alkalische Lyse

10ml einer Übernachtsbakterienkultur in LB Medium mit 10µg/ml Ampicillin (Selektives Antibiotikum, Sigma) wurden auf 4°C abgekühlt und anschließend für 10 Min bei 1000xg zentrifugiert. Die pelletierten

Bakterien wurden in 250µl Maxi-Prep Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 500µl NaOH/SDS Lösung alkalisch aufgeschlossen. Nach Inkubation für 5-10 Minuten bei 4°C wurden 250µl 5M Kaliumazetatlösung zugegeben und für weitere 10 Min inkubiert. Dabei ausgefallenes Protein, Zellbruchstücke und chromosomale *E.coli*-DNS wurde durch Zentrifugation entfernt. Aus dem klarem Oberstand präzipitiert man mit 540µl Isopropanol bei -20°C für 20 Minuten die Plasmid-DNS. Nach dem durchgeführten Restriktionsverdau wurde für 30 Minuten bei 37°C mit RNase A (20µg/ml, Sigma) behandelt, damit hochmolekulare RNS ein mögliches Insert in der Gelelektrophorese nicht überdeckt.

Maxi-Prep Lösung pH 8,0: 5mM Glucose
 2,5mM Tris-HCL, pH8,0
 1mM EDTA

NaOH/SDS Lysepuffer: 200mM Natriumhydroxid
 1% Natriumlaurylsulfat

Kaliumazetat 5M : 60ml 5M Kaliumazetat
 11,5ml Eisessig
 28,5ml Aqua dest.

**Midi-Präparation von Plasmid DNS -enzymatische Lyse
 und Anionenaustauscherchromatographie**

QIAGEN™ Säulen (Diagen, Düsseldorf) bestehen aus einem Anionenaustauscher, der kovalent an ein speziell beschichtetes Silikagel gekoppelt ist. Zur Präparation von nicht mehr als 100µg Plasmid-DNS wird vom Hersteller der QIAGEN pack 100 und folgendes Protokoll empfohlen:

50ml einer Übernachtskultur wurden bei 1000xg zentrifugiert. Das Bakteri-enpellet wurde in 3,6ml eisgekühltem 50m Tris-HCL, pH7,4 resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellen wurden 8mg Lysozym (Sigma) in 0,4ml 50mM Tris-

HCL frisch gelöst und zugegeben. Nach Inkubation für 10 Minuten bei 4°C wurden 1ml 0,5ml EDTA pH8,0 dazugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200µl einer 2% Triton X-100 Lösung und Inkubation bei 4°C für 1 Stunde wurde bei 10.000xg zentrifugiert, um Zellbruchstücke und chromosomale *E.coli*-DNS zu entfernen. Das geklärte Lysat wurde mit RNase A bei einer Endkonzentration von 20µg/ml und anschließend mit Proteinase K (Sigma) bei einer Endkonzentration von 10µg/ml jeweils für 30 Minuten bei 37°C behandelt. Nachdem ausgefallenes Protein und RNS durch Zentrifugation bei 10.000xg für 10 Minuten präzipitiert wurden, ist das Lysat durch Zugabe von 1,1ml 5M Natriumchlorid und 0,5ml 1M MOPS Puffer pH7,0 auf eine Salzkonzentration von etwa 850mM eingestellt worden. Die QIAGEN pack 100 Säule wurde mit 2ml Puffer A equilibriert. Zur Adsorption der DNS an die Säule wurde das Lysat bei einer Durchflußrate von 1ml/Min mittels einer Spritze durch die Säule gedrückt. Zum Auswaschen von Proteinen, RNS und anderen Verunreinigungen wurden 5ml vom Puffer C innerhalb von 3 Minuten durch die Säule gedrückt. Die Plasmid DNS wurde anschließend mit 2ml vom Puffer F bei einer Durchflußrate von 1ml/Min eluiert.

Puffer A: 400mM Natriumchlorid
 50mM MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
 15% Ethanol
 pH7,00

Puffer B: 1000mM Natriumchlorid
 50mM MOPS
 15% Ethanol
 pH7,00

Puffer C: 1500mM Natriumchlorid
 50mM MOPS
 15% Ethanol
 pH7,50 !

Maxi-Präparation von Plasmid DNS -alkalische Lyse

Das Bakterienpellet einer 250ml Overnightkultur wurde in 7,5ml Maxi Prep Lösung (siehe unter Mini Prep) resuspendiert und nach Zugabe von 15ml NaOH/SDS Lysepuffer (siehe unter Mini Prep) für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. 7,5ml 5M Kaliumazetat Lösung (siehe unter Mini Prep) wurden zugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Die freigesetzte chromosomale *E.coli* DNS, Zellbruchstücke und Proteine wurden durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 8000xg pelletiert. Das geklärte Lysat wurde anschließend mit 3µg/ml Proteinase K bei 45°C für 30 Minuten behandelt und durch Zugabe des 0,6 Vol Isopropanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert. Die Plasmid DNS durch Zentrifugation pelletiert, wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 8ml TE-Puffer gelöst. Zur weiteren Aufreinigung der DNS wurde ein CsCL-Ethidiumbromid Dichtegradient für 18 Stunden bei 230.000 xg gefahren.

Genomische DNS - Schnellpräparation

Bei der Präparation von genomischer DNS muß unbedingt ein Brechen der DNS z.B. durch Scherkräfte vermieden werden.

1×10^8 Zellen in 200µl PBS resuspendiert, wurden mit 10ml 4M GT-Lösung (siehe unter RNS Isolierung) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur lysiert. Nach 3 maligem Phenolisieren wurde die genomische DNS mit 0,6 Vol Isopropanol für 30 Minuten bei -20°C als Faden präzipitiert, der sich leicht mit einem Glasstab angeln läßt. Die DNS wurde einmal in 70% Ethanol gewaschen und anschließend über Nacht in 1ml TE Puffer gelöst.

Southern blotting -(Maniatis et al., 1982)

Das Southern blotting (Southern, 1975) beschreibt eine Methode zum Transfer sowohl von klonierter als auch genomischer DNS auf einen Nitrozellulose oder Nylon Membranfilter.

0,2µg rekombinierte Plasmid-DNS oder 10µg genomische DNS wurden pro Gel Slot auf ein Agarose Gel aufgetragen, um später ein ausreichend starkes Signal zu erhalten. Nach der Elektrophorese wurden alle nicht benutzten Areale des Gels abgeschnitten und das Gel für 20 Minuten in 250mM Salzsäure gebadet. Dabei kommt es zu einer sauren Hydrolyse der DNS, wodurch der Transfer besonders von größeren Fragmenten erleichtert wird. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde das Gel zur Denaturierung der DNS in 1,5M Natriumchlorid, 0,5M Natronlauge für 45 Minuten inkubiert. Wiederum wurde zweimal mit Wasser gewaschen, bevor zur Neutralisierung das Gel in 1,5M Natriumchlorid 1M Tris-HCL, pH8,0 für 40 Minuten inkubiert wurde. Zum eigentlichen Transfer wurde auf einen Block von ca. 1cm Höhe eine Glasplatte gelegt und in eine mit 20x SSC gefüllte Wanne gestellt. Auf die Glasplatte wurden in folgender Reihenfolge geschichtet:

- # 1 Whatman 3MM Papier
- # das Agarosegel mit der Unterseite nach oben
- # Nylon Membranfilter (Hybond N, Amersham) in 2x SSC getränkt und zugeschnitten
- # 5 Schichten Whatman 3MM Papier
- # Papiertücher zu einer Höhe von 5cm
- # 1 Glasplatte und ein 5kg Gewicht

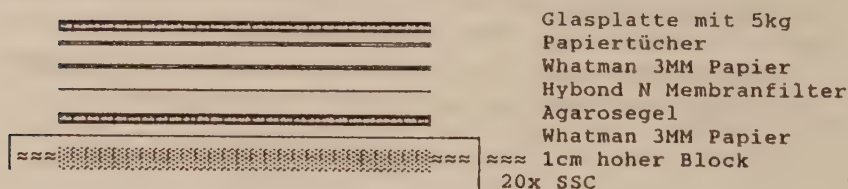


Abbildung zeigt den apparativen Aufbau des Southern blotting

Der Transfer erfolgte über Nacht, mindestens jedoch für 12 Stunden, wobei für Plasmidblots auch kürzere Transferzeiten möglich sind. Anschließend wurde der Hybond N Filter in 2x SSC gewaschen, getrocknet und für 5

Minuten mit UV-Licht fixiert.

20x SSC: 3M Natriumchlorid
 300mM Natriumcitrat

Northern blotting

Das Northern blotting beschreibt eine Methode zum Transfer von RNS aus einem denaturierendem Agarosegel auf einen Nitrozellulose oder Nylon Membranfilter, die nach dem gleichen Prinzip wie das Southern blotting erfolgt. Aufgetragen wurden je Probe 15µg Gesamt-RNS. Da RNS bereits in einzelsträngiger Form vorliegt, entfällt die Denaturierung.

Denaturierendes RNS Gel

-formaldehydhaltig (Maniatis et al.,1982)

Zu 1,2 g Agarose, in 62,2ml Aqua dest. geschmolzen, wurden nach Abkühlen auf 60°C 20ml 5x Laufpuffer und 17,8ml Formaldehyd 37% gegeben und in ein Gel-Tray gegossen. Die verwendeten Reagenzien müssen unbedingt frei von RNase Kontamination sein, um eine Degradierung der RNS zu vermeiden. Die RNS-Proben - für ein ausreichend starkes Signal 15µg Gesamt RNS - wurden durch Zugabe von

2µl 5x Laufpuffer
3,5µl Formalaldehyd 37%
10µl Formamid (deionisiert)
ad 20µl Aqua dest.

und Inkubation bei 55°C für 15 Minuten denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden 2µl Auftragspuffer zugegeben, die RNS-Proben auf das Gel geladen und mit 25 Volt über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt.

Laufpuffer: 0,2M MOPS pH7,0
 autoklaviert 50mM Natriumazetat
 1mM EDTA

Auftragspuffer: 50% Glyzerin
 1mM EDTA
 0,4% Bromphenolblau
 0,4% Xylenzyanol

Random-Primer-Labeling

Die Methode des Random-Primer-Labeling beschreibt ein Verfahren zur radioaktiven Markierung von cDNS-Proben durch eine random Oligonukleotid geprimte Synthese.

50-100ng cDNS in einem Volumen von 32µl Aqua dest. gelöst, wurden zur Denaturierung für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden für die Labeling Reaktion zugegeben:

10µl Oligolabelling Puffer
 2µl bovines Serumalbumin (10mg/ml, Sigma)
 5µl [α -³²P] dCTP (800µCi/ml, Amersham)
 0,5µl Klenow Polymerase (2 Einheiten)

und bei Raumtemperatur für 3-5 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200µl Stop Puffer beendet. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50 Säule (Pharmacia) entfernt. Abschließend wurde die Probe durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten wiederum denaturiert.

Oligolabelling Puffer: 3,6µl 2-Mercaptoethanol

1,0µl 0,1M α ATP
 1,0µl 0,1M α TTP
 1,0µl 0,1M α GTP
 500µl HEPES pH6,6 (Sigma)

200µl 1,25M Tris-HCL, pH8,0;
 125mM Magnesiumchlorid
 300µl Oligonukleotid random Primer
 (90µM/ml)

alle Nukleotide wurden in 0,1M TE Puffer gelöst

Stop Puffer: 20mM Natriumchlorid
 20mM Tris
 2mM EDTA
 0,25% Natriumlaurylsulfat
 1µM dCTP

Southern und Northern Blot Hybridisierung mit radioaktiven Proben

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungen wurde der Membranfilter zunächst bei 65°C für 2-5 Stunden mit 50µg/ml denaturierter Heringssperma-DNS (Sigma, gelöst in 20ml Hybridisierung Mix) inkubiert. Nach Zugabe der denaturierten Probe wurde über Nacht bei 65°C hybridisiert. Gewaschen wurde der Membranfilter unter stringenten Bedingungen jeweils für 45 Minuten bei 65°C mit 3xSSC, 1xSSC, 0,3xSSC und 0,1xSSC, das jeweils 0,1%Natriumlaurylsulfat enthielt, gewaschen um unspezifische Bindungen zu entfernen.

Hybridisierungs Mix: 30ml 20x SSC
 5ml Denhardt's Lsg. 100x
 1,25ml 10% Natriumlaurylsulfat Lsg.
 ad 100ml Aqua dest.

100x Denhardt's Lösung:
 2%(G/V) bovines Serumalbumin
 2%(G/V) Ficoll
 2%(G/V) Polyvinylpyrrolidon

DNS Sequenzierung mit Sequenase

Das Prinzip des Sequenzierens nach dem Verfahren von Sanger et al. (1977) liegt in der Zugabe von ddNTP bei der in vitro Synthese von DNS, wodurch es zu einem spezifischen Kettenabbruch kommt. Als Vorlage (template) dient dazu einzelsträngige DNS, an die in einem ersten Reaktionsschritt ein synthetischer Oligonukleotid Primer annealt wird. Dieser wird von der DNS-Polymerase unter Verwendung von dNTP's fortgeschrieben, wobei zur radioaktiven Markierung dATP durch [α - 32 S]thio-dATP ersetzt wird. In einem zweiten Reaktionsschritt kommt es durch die getrennte Zugabe von ddNTP's und dem damit verbundenen Fehlen der für die DNS-Elongation nötigen 3'OH-Gruppe immer dann zu einem Abbruch der Synthese, wenn gemäß einer statistischen Wahrscheinlichkeit statt des dNTP's ein ddNTP eingebaut wird. Es werden somit unterschiedlich lange Ketten synthetisiert, die z.B. in dem Reaktionsgefäß, in das ddATP gegeben wurde, immer nach einem ddATP abbrechen. Auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wird auf diese Weise eine Bestimmung der Nukleotidsequenz möglich.

Denaturierung doppelsträngiger DNS: Da die geprimte DNS-Synthese einzelsträngige template-DNS benötigt, hängt der Erfolg bei der Verwendung doppelsträngiger DNS entscheidend auch davon ab, wie effektiv die DNS denaturiert wurde. Eine vollständige Denaturierung wird durch einen pH-Wert oberhalb von pH12 erreicht (Chen et al., 1985).

Zu 2 μ g Plasmid-DNS (über CsCL Gradient oder Affinitätschromatographie aufgereinigt) wurden 20 μ l 200mM Natronlauge, 0,2mM EDTA gegeben und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit 2 μ l 2M Ammoniumazetat pH4,5 neutralisiert und mit Ethanol präzipitiert.

Sequenzierungsreaktion: Zur DNS Sequenzierung wurde der Sequenase™ Kit (USB, Cleveland, USA) gemäß den vom Hersteller gemachten Angaben verwendet. Bei dem Enzym Sequenase handelt es sich um die DNS-Polymerase des Bakteriophagen T7, deren 3'nach 5'Exonukleaseaktivität durch chemische Modifizierung inaktiviert wurde. Zum Annealing des Primers an die einzelsträngige template-DNS wurden diese in 7 μ l Aqua dest. gelöst, 1 μ l oligonukleotid-Primer (0,5pmol/ μ l M13-40 Primer oder M13 Reverse sequencing primer, Pharmacia), 2 μ l 5x Sequenase-Puffer

zugegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Im nächsten Reaktionsschritt wird ausgehend vom Primer der zweite Strang synthetisiert, wobei dieser durch Verwendung von [α - 35 S] dATP radioaktiv markiert wird. Dem Reaktionsansatz wurden zupipetiert:

- 1,0 μ l 100mM Dithiothreitol
- 2,0 μ l Mischung von dGTP, dCTP, dTTP (jeweils 1,5 μ M)
- 0,5 μ l [α - 35 S] dATP (10 μ Ci/ml, Amersham)
- 2,0 μ l Sequenase (1:8 verdünnt)

gut gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine längere Inkubationszeit bei gleichzeitiger Erhöhung der dNTP Konzentration führt zu einer Verschiebung der Sequenzinformation in Richtung 3', wobei nach dem angegebene Protokoll eine Sequenzlänge von 300-400 Nukleotiden erzeugt wird. Für die Kettenabbruchsreaktion wurden 4 Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 2,5 μ l des jeweiligen ddNTP Termination-Mix gefüllt und nach Zugabe von jeweils 3,5 μ l des Reaktionsansatzes gut geschüttelt und für 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Zugabe von 4 μ l Stop-Lösung beendet die Reaktion. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt und erst kurz vor dem Auftragen auf das Sequenziergel durch Erhitzen auf 95°C für 2 Minuten denaturiert. Das Sequenziergel wurde bei mittlerer Temperatur (55°C bei 2300 Volt, 40 Ampere) über einen Zeitraum von 1-4 Stunden gefahren. Zur gleichmäßigen Verteilung der Wärme wurde eine 4mm starke Aluminiumplatte an der Frontseite angebracht. Nach beendeter Elektrophorese wurde durch 20 minütiges Baden des Gels in 10% Essigsäure der Harnstoff herausgewaschen, das Gel über Nacht bei 60°C getrocknet und auf einem Kodak XAR-5 Film bei Raumtemperatur exponiert.

5x Sequenase Puffer: 200mM Tris-HCL, pH7,5
 100mM Magnesiumchlorid
 250mM Natriumchlorid

ddNTP Termination Mix: je 80 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 8 μ M des jeweiligen ddNTP's
 50mM Natriumchlorid

Stop Lösung: 95% Formamid

20mM EDTA

0,05% Bromphenolblau

0,05% Xylenzylanol FF

Herstellung eines DNS Sequenziergels

Zwei Glasplatten, eine als Repelcote bezeichnete mit dem Format 20x40cm und eine als Binding-Platte bezeichnete mit dem Format 20x38cm wurden mit flüssiger Seife und Alkohol gereinigt, ohne dabei die Oberfläche zu zerkratzen. Die Repelcote-Platte mit einem Film von Repelcote (2% Dimethyldichlorosilan in 1,1,1-Trichlorethan, LKB, Bromma, Schweden) übergossen, wurde, nachdem der Film eingetrocknet war, mit Alkohol gereinigt und mit einem Papiertuch poliert. Die so behandelte Glasplatte läßt sich später leicht von dem Polyacrylamid-Gel lösen. Auf der mit Binding bezeichneten Platte wurde eine Mischung aus

5ml Ethanol

15µl gamma-methacryloxypropyltrimethoxysilan (Sigma)

15µl Essigsäure

gleichmäßig verteilt und nach dem Eintrocknen mit einem Papiertuch poliert. Als Spacer wurde entweder ein 0,4mm oder ein 0,3-0,6mm Wedge-spacer verwendet. Zur Herstellung des Polyacrylamid-Gels wurden je 10ml Acrylamid Lösung 50µl 10%Ammoniumperoxodisulfat Lösung und 5µl TEMED zugegeben. Als Laufpuffer wurde 1x TBE Puffer verwendet.

Acrylamid Lösung: 6g Acrylamid (Biorad)

0,4g N,N'-Methylen-bis-Acrylamid (Biorad)

42g Harnstoff

1g AGTM501-x8(D) (Ionenaustauscher, Biorad)

10ml 10x TBE Puffer

ad 100ml Aqua dest.

Nährmedien und Puffer

RPMI 1640 Nährmedium: ergänzt mit
(Biochrom)

- 1mM Natriumpyruvat
- 2mM L-Glutamin
- 100U/ml Penicillin
- 100U/ml Streptomycin
- 5% foetales Kälberserum (Biochrom)

Einfriermedium für Hybridome und Zelllinien:

- RPMI 1640 Medium
- 20% foetales Kälberserum
- 10% Dimethylsulfoxid

LB Medium:

- 1% Bacto Trypton (Difco)
- 0,5% Bacto Yeast Extrakt (Dico)
- 1% Natriumchlorid

LB Agar:

- 1% Bacto Trypton
- 0,5% Bacto Yeast Extrakt
- 1% Natriumchlorid
- 1,5% Bacto Agar (Difco)

PBS pH7,4 (Phosphate Buffered Saline)

- 1,5mM Kaliumdihydrogenphosphat
- 8mM Dinatriumhydrogenphosphat
- 2,7mM Kaliumchlorid
- 139mM Natriumchlorid

TE Puffer:

- 10mM Tris-HCL, pH7,5
- 1mM EDTA, pH8,0

TBE Puffer:

- 100mM Tris
- 100mM Borsäure
- 2mM EDTA

Genotyp der Bakterienstämme

BB4 : SupF58, supE44, hsdR514(rk-,mk-), galK2, galT22,
trpR55, metB1, tonA, Lambda-, ^ (arg-lac)U169,
F' [proAB, lacI^sZ⁺M15, Tn10(tetr^r)]

JM101 : SupE, thi, ^ (lac-proAB), F' [traD36, proA+, prob+,
lacI^s, lacZ⁺M15]

MC1061/P3 : F-, araD139, ^ (ara, leu)7696, ^ lacX74, galU-, galK-
hsdR-, hsdM+, strA(P3)

Y1090 r-m+: ^ lacU169, proA+, ^ lon, araD139, strA, supF,
[trpC22::Tn10], (pMC9), hsdR-, hsdM+

Ergebnisse und Diskussion

Mit nur wenigen Ausnahmen (siehe Tabelle 1; als Review Johnson et al., in press) reagieren die derzeit bekannten MoAk gleichermaßen mit Nävuszell Nävi wie mit Melanomen und weisen somit keine Assoziation mit der Tumortransformation oder Tumorprogression auf. Eine effizientere Screeningmethode, wie das hier beschriebene in situ screening sollte in Verbindung mit einer 3-Tage Immunisierung zur Entdeckung neuer Melanom-assoziiierter Antigene führen, die nicht von Nävuszell Nävi exprimiert werden.

Der Vorteil der Kurzzeitimmunisierung -so die Annahme- liegt in der Induktion einer Immunantwort gegen das gesamte angebotene Antigenspektrum, während das üblicherweise angewendete Immunisierungsschema mit zwei- bis dreimaligen Boostern die Immunantwort zugunsten starker Immunogene verschiebt. Häufig jedoch zählen gerade die Tumor-assoziierten Antigene aufgrund ihrer meist geringen Konzentration zu den schwachen Immunogenen und werden durch das herkömmliche Immunisierungsschema nur unzureichend erfaßt.

Eine Variante des Immunisierungsprotokolls stellte die Injektion von 100mg Lipid A 14 Tage vor der Immunisierung dar. Der adjuvante Effekt von Lipid A, einem hydrolytischen Spaltprodukt des Lipopolysaccharides gram-negativer Bakterien, beruht auf der polyklonalen Aktivierung von Makrophagen und Milzzellen (Haeffner-Cavaillon et al., 1985). Die Immunisierung trifft somit auf ein polyklonal und unspezifisch prestimuliertes Immunsystem, sodaß der Antigenstimulus eine, im Vergleich zur Kurzzeitimmunisierung, verstärkte Immunantwort hervorrufen sollte.

Expression der von den MoAk MUC18 und MUC54 erkannten antigenen Determinanten in der Melanozyten Linie

Die MoAk MUC18 (Isotyp IgG2a) und MUC54 (Isotyp IgM) wurden wie unter *Material und Methoden* beschrieben erhalten. Die

Hybridomüberstände wurden dabei anfänglich auf unterschiedliche Reaktivität mit einer Melanom Lymphknotenmetastase und einem Nävuzell Nävus gescreent. Mit geringem Aufwand sind dadurch frühzeitig zahlreiche Informationen über das Antikörperreaktionmuster gewonnen worden, sodaß aus den etwa 800 (30% der getesteten Überstände) mit Melanomzellen reagierenden Hybridomüberständen nur die wirklich interessanten 0,5% herausselektioniert wurden.

Bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von benignen und malignen melanozytären Gewebsveränderungen bestätigte sich die anfänglich gemachte Beobachtung, daß die durch MoAk MUC18 und MUC54 definierten Antigene mit dem Auftreten des malignen Phänotypus assoziiert sind.

Als Isotypkontrollen bei der immunhistochemischen Analyse wurden die MoAk 141.11 (IgM) und UPC10 (IgG2a) verwendet. Um melanozytäre Zellen eindeutig von infiltrierenden Lymphozyten abgrenzen zu können, wurden die melanozytären Zellen mit dem konstitutiven Melanozytenmarker MoAk 225.28S (anti-chondroitinsulfat Proteoglykan) und infiltrierende Lymphozyten mit dem gegen das 'common leucocyte antigen' CD45 gerichteten MoAk Gap8.3 angefärbt. Darüberhinaus wurde der MoAk L243, der HLA-DR Produkte erkennt, eingesetzt um B-Lymphozyten und Makrophagen anzufärben. Bei der Beurteilung der Färbeergebnisse von MoAk L243 mußte jedoch berücksichtigt werden, daß HLA-DR auch von Melanomen im fortgeschrittenen Stadium exprimiert wird. Die histopathologischen Diagnosen der getesteten Melanome und Nävi wurden an den Dermatologischen Universitätskliniken von Hamburg, Münster und München erhoben.

Der Prozentsatz der in der Immunperoxidase-Färbung mit den einzelnen Antikörpern reagierenden melanozytären Gewebsveränderungen ist in Tabelle 2 aufgeführt. In 47% der 49 primären Melanomen und in 69% der 26 getesteten Melanommetastasen konnte das vom MoAk MUC18 definierte Antigen nachgewiesen werden. Mit dem MoAk MUC54 reagierten 76% der primären Melanome und 62% der Melanommetastasen. Beide Antikörper reagierten dabei jeweils nur mit einer Subpopulation von Tumorzellen und, wie in Serienschnitten gezeigt werden konnte, unabhängig voneinander.

Tabelle 2 Reaktion der MoAb MUC18 und MUC54 mit gut- und bösartigen melanozytären Veränderungen

Melanozytäre Veränderungen	Immunohistochemische Färbung mit	
	MUC18	MUC54
Nävuszell Nävi	1/39 ^a (3) ^b	4/39(10)
Junktional	0/4 (0)	0/4 (0)
Compound	1/18 (6)	0/18 (0)
Dermal	0/10 (0)	0/10 (0)
Congenital	0/3 (0)	1/3 (33)
Spitz Nävi	0/4 (0)	3/4 (75)
Dysplastische Nävi	0/16 (0)	5/14 (36)
Melanome	41/75 (55)	53/75 (71)
Primäre Melanome	23/49 (47)	37/49 (76)
Melanom Metastasen	18/26 (69)	16/26 (62)

^aAnzahl positiver Gewebe/Anzahl der mittels Immunperoxidase Technik getesteten Gewebe. Als negativ wurden nur solche Gewebe gewertet, in denen keine gefärbten Zellen nachweisbar waren. Isotypkontrollen waren 141.11(IgM) und UPC10(IgG2a).

^bDie in der Klammer stehende Zahl gibt den Prozentsatz der positiv reagierender Gewebsveränderungen an.

Abbildung 3a zeigt exemplarisch, daß die Färbung mit dem MoAk MUC18 membranständig ist, ein Sachverhalt der im nachhinein durch Oberflächenjodierung und Immunfluoreszenz-Färbung an unfixierten Zellen bestätigt werden konnte.

Das Färbemuster vom MoAk MUC54 erscheint zytoplasmatisch (Abbildung 3b), ein Befund der ebenfalls später durch das ausschließliche reagieren des MoAk MUC54 mit fixierten Zellen bestätigt werden konnte.

Abbildung 4 zeigt die Reaktion der MoAk MUC18, MUC54 und als Positivkontrolle der MoAk 225.28S mit einem compound Nävus. Im Gegensatz zu der häufigen Reaktion mit Melanomen färbt der MoAk MUC18 vereinzelte Nävusnester in nur einen von 55 getesteten Nävi (Tabelle 2). Das Untersuchungsmaterial setzte sich dabei aus 35 nevozellulären, vier Spitz- und 16 dysplastischen Nävi zusammen. Auch der MoAk MUC54 reagierte mit nur einem der 35 nevozellulären Nävi - einem congenitalem Nävus,

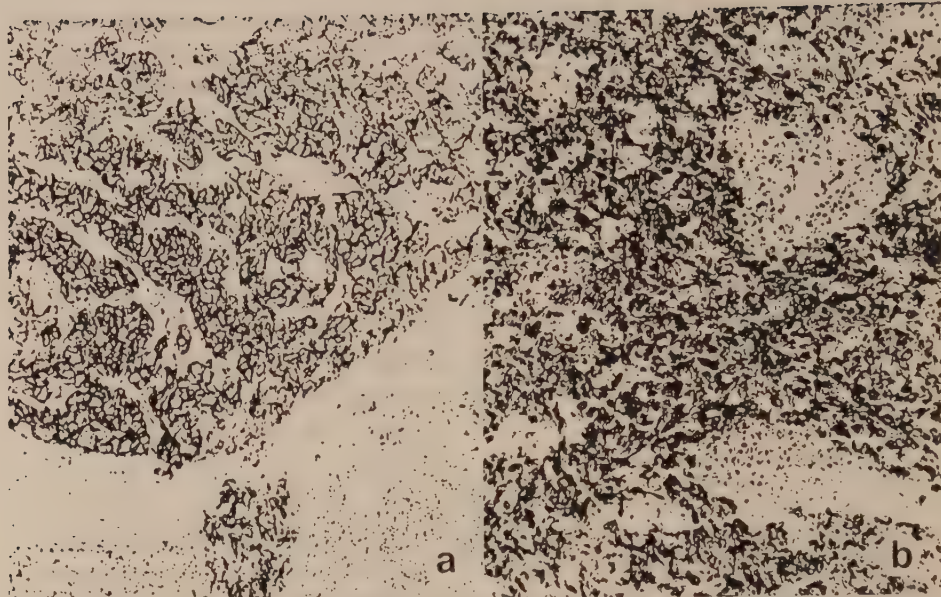


Abbildung 3: Immunperoxidase-Färbung von Melanom Lymphknotenmetastasen
a, MoAk MUC18 b, MoAk MUC54 Originalvergrößerung a, x125; b, x150



Abbildung 4: Immunperoxidase-Färbung eines compound Nävus a, MoAk MUC18
b, MoAk MUC54 c, MoAk 225.28S Originalvergrößerung, x150

der sich in der Nähe eines primären Melanoms befand (Tabelle 2).

Anders als beim MoAk MUC18 scheint die Reaktivität des MoAk MUC54 mit dem Vorhandensein einer gesteigerten Aktivität (Hyperplasie) und/oder histologischen Zellatypie in Nävi zu korrelieren. So färbte der MoAk MUC54 drei von vier Spitz- und fünf der 15 getesteten dysplastischen Nävi. Auch in diesen Geweben wird, wie im Melanom bereits beobachtet, nur eine Subpopulation der Nävuszellen angefärbt. In sieben Fällen fand sich eine Reaktion des MoAk MUC54 mit anscheinend normalen Melanozyten, während die Nävuszellen selbst negativ waren. In vier primären Melanomen wurde darüber hinaus die Epidermis, die über den Tumorzellen lag, gefärbt, während die Epidermis in den angrenzenden normalen Hautarealen negativ war.

Expression der durch die MoAk MUC18 und MUC54 definierten Antigene im Verlauf der Tumorprogression in der Melanozyten Linie

Aufgrund des leichten Zugangs zu den gutartigen aktivierten Melanozyten der Nävi war es möglich zu zeigen, daß das vom MoAk MUC18 definierte Antigen oder zumindest das von ihm definierte Epitop mit einer Ausnahme ausschließlich in transformierten Melanozyten exprimiert wird. Das vom MoAk MUC54 definierte Antigen scheint demgegenüber bereits von besonders stark aktivierten Melanozyten exprimiert zu werden.

Um die Antigenexpression nun in Beziehung zur Tumorprogression setzen zu können, wurden die primären Melanome nach ihrer Infiltrationstiefe (d.h. Breslow Index) gelistet.

Tabelle 3: *Schrittweise Expression der Melanom assoziierten Antigene MUC18 und MUC54 während der Tumorprogression*

Antikörper	NNävus	DNävus	Primäres Melanom				Metastase
			I ^a	II	III	IV	
MUC54	7(41) ^b	31(16)	53(17)	73(15)	73(15)	87(15)	63(30)
MUC18	2(41)	0(19)	6(17)	40(15)	60(15)	80(15)	71(31)

^a Einteilung der primären Melanome gemäß Breslow Index

I= $\leq 0,75$; II= 0,76-1,50; III= 1,51-3,0; IV= $\geq 3,0$

^b Prozentsatz der als positiv bewerteten Gewebe, in Klammern die absolute Zahl der mittels Immunperoxidase Färbung getesteten Gewebe. Dabei wurden Präparate mit mehr als 5% gefärbter Zellen als positiv bewertet, als negativ dagegen nur solche in denen keine Zelle gefärbt wurde.

^c Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Fisher's exakter Wahrscheinlichkeitstest) in der Antigenexpression zwischen 2 Arten von melanozytären Gewebsveränderungen.

Wie aus Tabelle 3 und aus der graphischen Darstellung der Daten in Abbildung 5 deutlich ersichtlich, lassen sich dysplastische Nävi von nevozellulären Nävi durch einen statistisch signifikanten Anstieg in der Expression des MUC54 Antigens unterscheiden. So reagierten nur 7% der nevozellulären Nävi gegenüber 31% der dysplastischen Nävi. Im weiteren Verlauf der Tumorprogression stieg sowohl die Häufigkeit der MoAk MUC54 positiven Tumore als auch die Zahl positiver Tumorzellen innerhalb eines Tumors weiter an. In der Gruppe der frühen Melanome mit einer Tumordicke $\leq 0,75$ mm reagierten 53%. Mit voranschreitender Progression nahm die Reaktion weiter zu und war mit 87% in der Gruppe der Melanome mit einer Invasionstiefe $\geq 3,0$ mm am stärksten. Unter den Melanommetastasen wiesen dann nur noch 63% eine MUC54 Antigenexpression auf, was einen statistisch leicht signifikanten Antigenverlust darstellt.

Wie bereits erwähnt, zeigte der MoAk MUC18 mit einer Ausnahme keine Reaktion, weder mit nevozellulären noch mit dysplastischen Nävi. Auch in den frühen Melanomen ($\leq 0,75$ mm) ist das Antigen mit 6% nur sporadisch exprimiert. Im weiteren Verlauf der Tumorprogression kommt es ab einer Infiltrationstiefe von 1,0mm, also dem Zeitpunkt zu dem erstmals ein Auftreten von

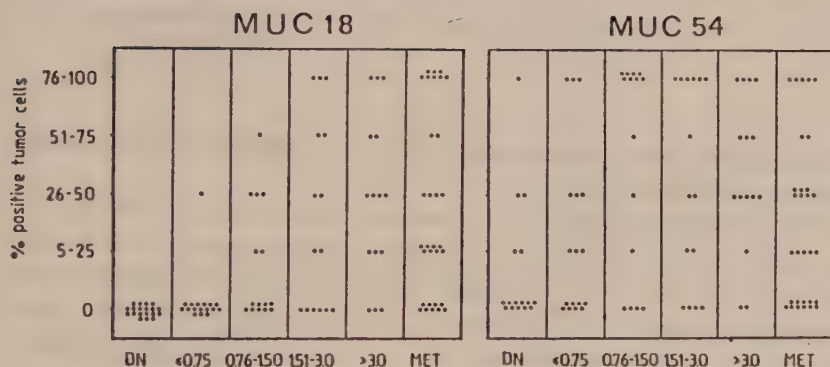


Abbildung 5: Reaktionsmuster der MoAk MUC18 und MUC54 mit unterschiedlichen melanozytären Veränderungen. Jeder Punkt verkörpert ein einzelnes Gewebe. Der Prozentsatz positiver Zellen innerhalb eines Gewebes wurde in fünf Intensitätsgruppen unterteilt (0, 5-25, 26-50, 51-75, 76-100).

Melanommetastasen beobachtet wird, zu einem signifikanten Anstieg in der Häufigkeit positive reagierender Tumore. Parallel dazu nahm die Zahl positiver Tumorzellen innerhalb eines Melanoms zu. So reagierten durchschnittlich 40% der Melanome mit einer Dicke von 0.76-1.50mm, 60% derer zwischen 1.51-3.0mm und 80% aus der Gruppe der Melanome mit einer Eindringtiefe von über 3.0mm. Von den getesteten Melanommetastasen reagierten 71%, sodaß die Metastasen im Vergleich zu fortgeschrittenen Melanomen das MUC18 Antigen nicht häufiger exprimieren.

Beide Antikörper MUC18 und MUC54 beschreiben somit Produkte, deren Expression während der Tumorprogression genetisch unterschiedlich reguliert wird. Das Auftreten der Expression des MUC18 Antigens ist demzufolge mit dem Eintritt des Melanoms in die vertikale Wachstumsphase korreliert. Dieses könnte bedeuten, daß das MUC18 Antigen Melanomzellen mit einer Fähigkeit ausstattet, die zur erfolgreichen Metastasie-

nung ihren Beitrag beisteuert. Das MUC54 Antigen ist entsprechend seines Expressionmusters mit einer gesteigerten Aktivität und Zellatypie korreliert, wie sie beim Übergang des Nävuszell Nävus in den dysplastischen Nävus auftritt.

Reaktion der MoAk MUC18 und MUC54 mit operativ entfernten Normal- und Tumorgewebe

Um die Reaktivität beider Antikörper außerhalb der Melanozyten Linie zu charakterisieren, wurden Gefrierschnitte einer repräsentativen Anzahl neoplastischer und normaler Gewebe auf Antigenexpression hin untersucht. Es zeigte sich dabei, daß einzig die glatte Muskulatur der Blutgefäße und in einigen Fällen die Keimzellen der Haarfollikel vom MoAk MUC18 angefärbt wurden. Die glatte Muskulatur von Darm, Magen und Lunge, Skelettmuskulatur, aber auch alle anderen getesteten Gewebe - normale, gutartig proliferierende Gewebsveränderungen und Tumore verschiedenen histologischen Ursprungs - zeigten demgegenüber keinerlei Reaktion. In einigen Präparaten, meist gastrointestinale Schleimhaut, kam es wie mit der Isotypkontrolle, vermutlich aufgrund von Fc-Rezeptor Bindung des Antikörpers, zu einer leichten unspezifischen Reaktion. In Gewebeschnitten, die Blutgefäße enthielten, diente die Reaktion mit der glatten Muskulatur der Blutgefäße als interne Positiv-Kontrolle.

Die Gewebsverteilung des MUC54 Antigens ist etwas breiter (Tabellen 4,5). In Normalgewebe wird das Antigen von der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes, von Hepatozyten, Nierentubuli und von dendritischen Zellen in den Keimzentren von Lymphknoten exprimiert. In einigen Tumoren, die in Tabelle 5 aufgeführt sind, kam es zu einer Reaktion mit Subpopulationen von Tumorzellen. Es fiel dabei auf, daß die Reaktion mit Hepatozyten und der Schleimhaut von Magen und Darm im Vergleich zu der im malignen Gegenstück im Normalgewebe wesentlich stärker war.

Tabelle 4: Reaktion der MoAk MUC18 und MUC54 auf Normalgewebe und gutartigen Veränderungen

Gewebe die positiv reagieren mit MoAk	
MUC18	MUC54
Glatte Muskulatur der Blutgefäßwände	Hepatozyten(4/4) ^a
Haarfollikel	Schleimhaut
	Dickdarm(9/9)
	Dünndarm(2/2)
	Magen(2/5)
	Intestinale Metaplasie(2/2)
	Nierentubuli(3/3)
	Dendritische Zellen in Lunge und Keimzentren der Lymphknoten
	Lymphatische Gefäße
Gewebe ohne Reaktion mit MoAk	
MUC18	MUC54
Haut Epidermis	Haut Epidermis
Schweißdrüsen	Schweißdrüsen
Talkdrüsen	Talkdrüsen
	Haarfollikel
Lunge(3)	Lunge(3)
Milz(1)	Milz(1)
Thymus(2)	Thymus(2)
Lymphknoten(3)	
Niere(3)	
Leber(4)	
Gallengänge(4)	Gallengänge(4)
Magen(4)	
Intestinale Metaplasie(2)	
Dickdarm(10)	
Dünndarm(2)	
Gallenblase(1)	Gallenblase(1)
Pankreas(1)	Pankreas(1)
Schilddrüse	Schilddrüse
Struma(2)	Struma(2)
Mamma	Mamma
Mastopathie(2)	Mastopathie(2)
Großhirn(1)	Großhirn(1)
Kleinhirn(1)	Kleinhirn(1)
Skelettmuskulatur(1)	Skelettmuskulatur(1)
Glatte Muskulatur	Glatte Muskulatur
Magen, Darm & Lunge	Magen, Darm & Lunge
Knochenmark(2)	Knochenmark(2)
Blutzellen	Blutzellen
PBL ^b (5)	PBL(5)
PHA ^c -stimulierte PBL(5)	PHA stimulierte PBL(5)

^aAnzahl positiv reagierender Gewebe/Anzahl mittels Immunperoxidase Technik getesteter Gewebe. Als negativ wurden nur solche Gewebe gewertet in denen keine gefärbten Zellen nachweisbar waren. Isotypkontrollen waren 141.11(IgM) und UPC10(IgG2a)

^bPeriphere Blut Lymphozyten

^cPhytohemagglutinin

Tabelle 5: Reaktion der MoAk MUC18 und MUC54 auf bösartigen Tumoren verschiedenen histologischen Ursprungs

Tumor ^a	Immunhistochemische Färbung mit	
	MUC18	MUC54
Colorektales Karzinom	0/9 ^b	8/9
Magenkarzinom	0/8	6/8
Mammakarzinom	0/10	5/9
Ovarialkarzinom	0/3	3/3
Nierenkarzinom	0/4	0/4
Nebennierenrindenkarzinom	0/1	1/1
Bronchialkarzinom	0/1	0/1
Schilddrüsenkarzinom	0/1	0/1
Vaginalkarzinom	0/1	1/1
Chorionkarzinom	0/1	0/1
Retinoblastom	0/1	0/1
Basaliom	0/1	0/1
Gliom	0/2	0/2
Neuroblastom	0/1	0/1
Epstein-Barr Virus trans- formierte B-lymphoblastoide Zelllinien	0/16	0/8
Burkitt's Lymphom ^c	0/3	0/3
T-Zell Leukemie ^d	0/3	0/3

^aAls negativ wurden nur solche Tumore bewertet in denen keine gefärbten Zelle nachweisbar waren. Isotypkontrollen waren 141.11(IgM) und UPC10(IgG2a).

^bAnzahl positiver Gewebe/Anzahl mittels Immunperoxidase Technik getesteter Gewebsveränderungen

^cBurkitt's Lymphom: Daudi; Raji; und Ramos

^dT-Zelllinien: Molt4; CEM; und Jurkat

Trotz der geringen pro Gewebeart getesteten Anzahl von Präparaten muß davon ausgegangen werden, daß die MUC54 Antigenexpression in diesen epithelialen Zellen eine physiologische Funktion erfüllt und nicht, wie in den sich von neuroektodermalen Zellen ableitenden Melanozyten, mit Hyperplasie und Zellatypie assoziiert ist.

Reaktion der MoAk MUC18 und MUC54 mit Zelllinien

Von zahlreichen Zelllinien wurden Zytospinpräparate angefertigt und mittels Immunperoxidase-Färbung auf Antigenexpression hin untersucht. Bei der Interpretation der Ergebnisse

Tabelle 6: Reaktion der MoAk MUC18 und MUC54 mit Zelllinien

Gewebe			Zelllinie			
MUC18	Melanom	8/10 ^a	Mel JuSo	+++ ^b	SkMel25	0
			Mel Im	++	SkMel28	+++
			Mel Ho	++	A375	0
			Mel Wei	++	Parl	++
			SkMel 1	+	IgR3	+
			B16F1 (Maus)	0		
	Gliom	4/4	N18	+	N63	+
			N59	+	N64	+

	Kolonkarzinom	0/5	DLD1; HT29; LoVo; LS180; WiDr;			
	Mammakarzinom	0/3	BT20; MDAM; SkBr3			
	Neuroblastom	0/2	SkN-MC; SkN-SH			
	Myeloide Leukemie	0/3	HL60; K562; U937			
	Zervikalkarzinom	0/1	HeLa			
Fibroblasten	0/2	HF; GM637(SV40)				
#####						
MUC54	Melanom	8/9	Mel JuSo	++	SkMel25	+
			Mel Im	+	SkMel28	++
			Mel Wei	++	A375	0
			SkMel 1	+	Parl	+
			B16F1 (Maus)	0		
	Kolonkarzinom	3/5	DLD1	0	LS180	+
			HT29	+	WiDr	+
			LoVo	0		

	Mammakarzinom	0/3	BT20; MDAM; SkBr3			
	Myeloide Linien	0/3	HL60; K562; U937			
	Zervikalkarzinom	0/1	HeLa			

^a Anzahl positiver Zelllinien/Anzahl mittels Immunperoxidase Technik getesteter Zelllinien. Als negativ wurde bewertet, wenn keine Zelle gefärbt wurde. Isotypkontrollen waren 141.11(IgM) und UPC10(IgG2a)

^b Die Intensität der Färbung wurden in 3 Stufen unterteilt + positiv; ++ deutlich positiv; +++ stark positiv

muß berücksichtigt werden, daß Zellen unter den Bedingungen der Gewebekultur ihren Phänotyp ändern können, und somit keine direkten Rückschlüsse auf die Antigenexpression in vivo möglich sind.

Während das MUC18 Antigen auf den untersuchten Zelllinien neben acht von zehn Melanom-Linien nur noch von vier der vier Gliom Linien exprimiert wurde, läßt sich das MUC54 Antigen auf sieben der acht Melanom-Linien und auf drei der fünf Kolonkarzinom-Linien nachweisen. Die Mausmelanom-Linie B16F1 zeigte mit beiden MoAk keine Reaktion.

Gliome als Geschwülste der Gliazellen stammen vom gleichen Keimblatt (Ektoderm) wie die Melanozyten ab, und weisen demzufolge eine nahe Verwandtschaft zueinander auf. Da alle der getesteten Gliom Zelllinien eine Reaktion zeigten, muß, obwohl die beiden in situ getesteten Gliome als negativ bewertet wurden, davon ausgegangen werden, daß die Zahl der in situ getesteten Gliome zu gering war und, daß das MUC18 Antigen aller vorrausicht nach doch von Gliomen exprimiert wird.

Biochemische Charakterisierung der durch die MoAk MUC18 und MUC54 definierten Antigene

Um über die Antigenexpression hinaus die biochemische Struktur der Antigene weiter zu beschreiben, wurden Melanomzelllinien radioaktiv markiert. Zum Nachweis des MUC18 Antigens war aufgrund der nachgewiesenen Lokalisation in der Zytoplasmamembran eine Oberflächenjodierung durchgeführt worden. Die markierten Zellen wurden anschließend mit Detergenz lysiert und das Antigen durch Immunpräzipitation isoliert. Wie das Autoradiogramm in Abbildung 6 zeigt, präzipitiert der MoAk MUC18 unter reduzierenden Bedingungen ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 113.000 Dalton (Spuren a und b). Unter nicht reduzierenden Bedingungen wandert das Präzipitat auf 98.000 Dalton (Daten sind nicht gezeigt). Dieser Unterschied im Molekulargewicht läßt sich durch das Vorhandensein von Disulfidbrücken erklären, die unter reduzierenden Bedingungen aufgespalten werden. Ein Vergleich des Immunpräzipitats verschiedener Melanomlinien ergab keinen Unterschied

hinsichtlich des Molekulargewichtes. Verdaut man das Immunpräzipitat mit Neuraminidase, verringert sich das scheinbare Molekulargewicht von 113.000 auf 100.000 Dalton (Abbildung 6, Spur C). Durch Glycopeptidase F (Glycopeptid-N-Glycosidase) Behandlung, wodurch Asparagin gebundene Zuckerketten abgespalten werden, reduziert sich das scheinbare Molekulargewicht auf 65.000 Dalton, was in etwa dem des Proteingrundgerüsts von MUC18 entsprechen sollte (Daten sind nicht gezeigt). Bei dem MUC18 Antigen handelt es sich somit um ein membranständiges einzelsträngiges Glycoprotein mit intramolekularen Disulfidbrücken. Die vorhandenen Zuckerketten sind endständig mit Neuraminsäuren beladen.

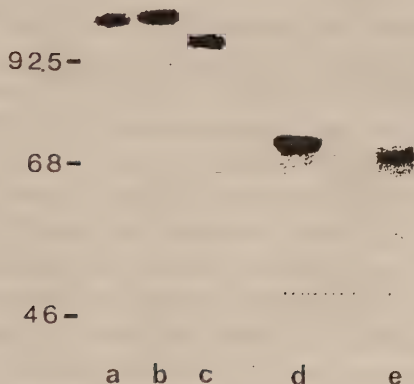


Abbildung 6: Autoradiogramm der Immunpräzipitate der MoAk MUC18 und MUC54, präzipitiert von radioaktiv markierten Melanomzellen und analysiert mittels Natriumlaurylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (7,5% Acrylamid). Die Lokalisation der Molekulargewichtstandards Ovalbumin (Mr 46.000), Bovines Serumalbumin (Mr 68.000) und Phosphorylase b (Mr 92.500) ist links angezeigt. *Spur a*, Antigen präzipitiert durch MoAk MUC18 von ^{125}I markierten Mel JuSo Zellen, reduziert; *Spur b*, Antigen präzipitiert durch MoAk MUC18 von ^{125}I markierten Mel Ho Zellen, reduziert; *Spur c*, Antigen präzipitiert durch MoAk MUC18 von ^{125}I markierten Mel Ho Zellen, für 1 Stunde bei 37°C mit 0,5 Einheiten Neuraminidase verdaut, reduziert; *Spur d*, Antigen präzipitiert durch den MoAk MUC54 von $[^3\text{S}]$ Methionin markierten Mel JuSo Zellen, reduziert; *Spur e*, Antigen präzipitiert durch den MoAk MUC54 von $[^3\text{S}]$ Methionin markierten Mel JuSo Zellen, unreduziert;

Zur biochemischen Charakterisierung des MUC54 Antigens war aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisierung eine metabolische Markierung mit [35 S] Methionin gewählt worden. Optimale Markierungsergebnisse wurden erzielt, wenn für 4 Stunden markiert und Taurocholsäure als Detergenz bei der anschließenden Zellyse verwendet wurde. Der MoAk MUC54 präzipitiert unter reduzierenden Bedingungen ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 76.000 Dalton (Abbildung 6 Spur D). Unter nicht reduzierenden Bedingungen verringert sich das Molekulargewicht auf 70.000 Dalton (Abbildung 6, Spur E), sodaß es sich bei dem MUC54 Antigen um ein einzelsträngiges zytoplasmatisches Protein mit intramolekularen Disulfidbrücken handeln sollte.

Isolierung der gegen das denaturierte MUC18 Antigen gerichteten MoAk MUCBA18.1-18.5

Im bisherigen Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, daß das MUC18 Antigen mit der Tumorprogression im Melanom assoziiert ist und somit möglicherweise einen Beitrag zur erfolgreichen Metastasierung leistet. Um die Molekülstruktur und die sich daraus ergebende Funktion des MUC18 Glykoproteins aufzuklären, ist die Kenntnis der Proteinprimärstruktur von großem Nutzen. Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Schritt MoAk gegen denaturiertes MUC18 Antigen hergestellt - also Antikörper, die unter den Konditionen des Western blotting mit dem Antigen zu reagieren vermögen. Diese MoAk sollten dann in einem zweiten Schritt zum Screening einer selbst hergestellten Melanom-cDNS-Expressions-Genbank verwendet werden. Wie unter *Material und Methoden* näher beschrieben, wurde eine Maus mehrmals mit isoliertem hitzedenaturierten MUC18 Antigen immunisiert, und die erhaltenen Hybridomüberstände mittels Immunoblotting gescreent. Die so isolierten MoAk MUCBA18.1-18.5 (alle vom Isotyp IgG1) reagierten im Western blotting mit dem denaturiertem MUC18 Antigenpräzipitat (Abbildung 7) und präzipitierten von radioaktivmarkierten Mel JuSo Melanomzellen ausnahmslos nur ein Protein, dessen Molekulargewicht exakt dem des MUC18 Glykoprotein entsprach (Daten sind nicht

gezeigt). Die MoAk sind somit ausreichend spezifisch für das MUC18 Glykoprotein, um mit ihnen eine Expressions-Genbank zu screenen.

Alle fünf Antikörper reagierten auf Gefrierschnitten intensiv mit Melanomzellen, während allein der MoAk MUCBA18.4 in der Immunfluoreszenz mit unfixierten Melanomzellen reagierte. Das durch ihn definierte Epitop sollte sich folglich von dem der anderen 'Blotting' Antikörper unterscheiden.

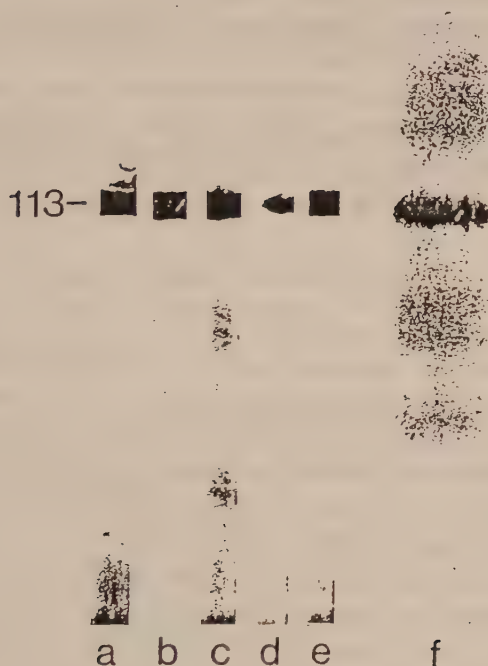


Abbildung 7: Immunoblot Analyse des mittels Natriumlaurylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (7,5% Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennten MUC18 Immunpräzipitates. *Spur a*, MoAk MUCBA18.1; *Spur b*, MoAk MUCBA18.2; *Spur c*, MoAk MUCBA18.3; *Spur d*, MoAk MUCBA18.4; *Spur e*, MoAk MUCBA18.5; *Spur f*, Antigen präzipitiert durch den MoAk MUCBA18.1 von der glatten Muskulatur eines Magens gefärbt mit MUCBA18.1.

Wie bereits für den MoAk MUC18 beschrieben, wurde die glatte Muskulatur der Blutgefäße auch durch die 'Blotting'-Antikörper stark angefärbt. Vereinzelt zeigten sich auch Reaktionen mit Gefäßendothel und eine, wenn auch wesentlich schwächere, Reaktion mit einzelnen Nävuspräparaten sowie mit der glatten Muskulatur von Magen, Darm und Lunge. Dieses im Vergleich zum ursprünglichen MoAk MUC18 breitere Reaktionsmuster wurde im Detail jedoch nicht weiter charakterisiert.

Bemerkenswert ist, daß aus der glatten Muskulatur eines Magens mit Karzinombefalls unter Verwendung des MoAk MUCBA18.1 ein Protein präzipitiert werden konnte, das ein zum MUC18 Glykoprotein nahezu identisches Molekulargewicht aufweist (Abbildung 7). Die Reaktion des MoAk MUC18 mit der glatten Muskulatur scheint folglich nicht auf einem kreuzreagierenden Epitop zu beruhen, sondern weist daraufhin, daß es sich beim MUC18 Antigen um ein physiologisches Produkt der glatten Muskulatur handelt.

cDNS-Klonierung des MUC18 Antigens

Zur Herstellung einer humanen Melanom cDNS Expressions-Library wurde Total-RNS aus mycoplasmafreien, mit Interferon-gamma (50U/ml) stimulierten Mel Juso Zellen mittels des Guanidinisothiocyanat-Verfahrens gewonnen und wie in *Material und Methoden* näher beschrieben in cDNS übersetzt. Zum Screening von 120.000 unabhängigen Rekombinanten im Expressionsvektor *Lambda zap* und von 75.000 unabhängigen Rekombinanten im Expressionsvektor *Lambda gt11* wurden die 1:1 gepoolten Hybridomüberstände der fünf 'Blotting'-Antikörper verwendet. Der cDNS Klon Zapyl wurde aus der *Lambda zap* Library gepickt, während acht weitere cDNS-Klone, im weiteren als Drop 1-8 bezeichnet, aus der *Lambda gt11* Library stammen. Tabelle 7 zeigt, daß das Reaktionsmuster der MoAk MUC18 und MUCBA18.1-18.5 mit dem Fusionsprotein der cDNS-Klone wenn auch ähnlich, doch nicht identisch ist.

Tabelle 7: Reaktionsmuster der MoAk MUC18 und MUCBA18.1-18.5 mit den Lambda Klonen

MoAk	Zapyl	Drop1	Drop4	Drop6	Drop2	Drop3	Drop5	Drop7	Drop8
MUC18									
MUCBA18.1									
18.2									
18.3									
18.4									
18.5									

weiß keine Reaktion;  positive Reaktion;  stark positive Reaktion

Die Hybridisierung der isolierten Klone gegeneinander ergab, daß sie sich in drei nicht miteinander kreuzhybridisierende Gruppen unterteilen lassen (Daten sind nicht gezeigt).

Gruppe I : Zapyl, Drop1, Drop4, (Drop6)

Gruppe II : Drop2, Drop3, Drop5

Gruppe III: Drop7, Drop8

Um eine erste Entscheidung zu treffen, welche der Gruppen die Klone enthält, die für MUC18 kodieren, wurden Northern blot Analysen durchgeführt.

Der Northern blot mit Drop4 als Probe ergab ein Verteilungsmuster, das dem der Antigenexpression von MUC18 entspricht (Abbildung 9), worauf die Klone der Gruppe I für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden. Die Klone Drop3 und Drop8 als Vertreter der Gruppen II und III reagierten dagegen mit einer mRNA-Bande, die von allen untersuchten Zellen gleichermaßen exprimiert wurde und für Drop3 bei 2.500b und für Drop8 bei 2.900b lag (Daten sind nicht gezeigt). Worauf die positive Reaktion der 'Western blotting' Antikörper mit diesen Klonen im Immunoblotting zurückzuführen ist, bedarf noch der weiteren Untersuchung.

Überraschenderweise zeigten die Klone der Gruppe I, obwohl sie miteinander kreuzhybridisieren, in der Restriktionsana-

gescreent, und drei weitere Klone Drop 4.2, Drop 4.7 und Drop 4.11 isoliert. Die nun 6 überlappenden Klone dieser Familie enthalten die Sequenzinformation für 3.303b, was der ungefähren Größe der mRNA entspricht, mit der diese Klone hybridisieren.

Eine schematische Darstellung der Lage dieser Klone zueinander wird in Abbildung 8 gezeigt.

MUC18 mRNA und genomische DNS

Das MUC18 Glykoprotein, beziehungsweise das vom MoAk MUC18 definierte Epitop konnte bis heute außer auf Melanomen auf keinem anderen Tumor nachgewiesen werden, und in normalen Geweben scheint die Expression auf die glatte Muskulatur der Blutgefäße beschränkt zu sein.

Um das Expressionsmuster der MUC18-RNS weiter zu untersuchen, wurde die [³²P] markierte MUC18 cDNS-Probe mit der Gesamt-RNS einer Vielzahl histogenetisch unterschiedlicher Zelllinien hybridisiert. Die Northern blot Analysen zeigten dabei für Melanom-Zelllinien ein Verteilungsmuster, das vollständig mit dem der Expression des MUC18 Proteins übereinstimmt. Sowohl das Autoradiogramm als auch die Durchflußzytometrischen Daten (FAC Scan, Abbildung 9) weisen einen hohen Gehalt an MUC18 Glykoprotein bzw. 3.303b mRNA für Mel JuSo und SKMel28 Zellen auf, eine geringere Konzentration in SKMel1 Zellen, während SKMel25 und A375 Zellen in beiden Verfahren negativ waren.

Eine geringe Menge an 3.303b mRNA zeigte sich darüber hinaus in der Maus-Melanom-Zelllinie B16F1, sowie in der Kolonkarzinom-Linie HT29 und in der Mammakarzinom-Linie SKBr3. Alle drei Zelllinien zeigten jedoch keine Reaktion mit dem MoAk MUC18 (Tabelle 6). Auch wenn sich die Transkription des MUC18 Gens in diesen Zellen durch eine unter Gewebekulturbedingungen hervorgerufene Veränderung in der Genregulation erklären lassen sollte, so bleibt doch die Frage offen: Wieso wird in diesen Zellen das MUC18 Epitop nicht synthetisiert oder woran liegt es, daß in diesen Zellen das MUC18 Glykoprotein trotz anscheinend ausreichender mRNA-Menge nur in geringsten Mengen synthetisiert wird ?

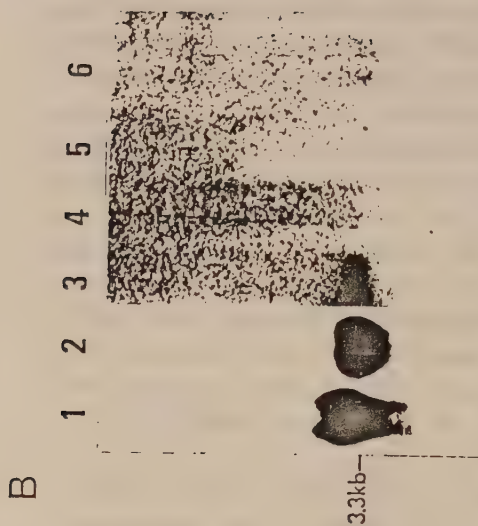
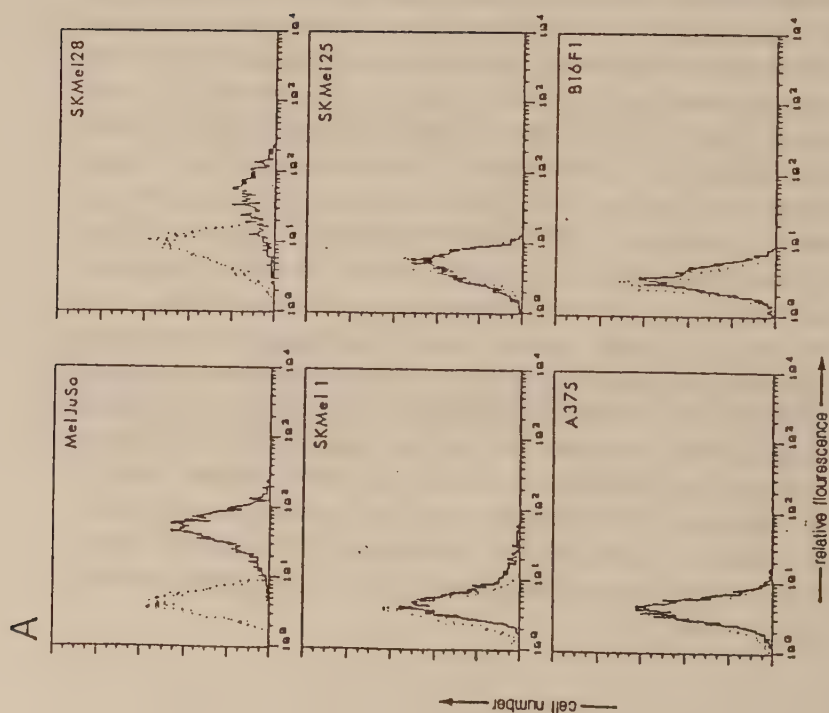


Abbildung 9: Charakterisierung der Expression von HUC18 auf Protein- und auf mRNA Ebene. a, Immunfluoreszenzfärbung des NoAk HUC18 (---Linie) und des Isotypkontrollantikörpers UPCI0 (---Linie) auf Melanonzellen. b, Northern blot Analysen unter Verwendung von 20ng Gesamt RNA und einer [³²P] markierten HUC18 cDNA Probe. 1.Mel JuSo; 2.SKmel28; 3.SKmel1; 4.SKmel25; 5.A375; 6.B16F1;

Das Vorhandensein einer 3.303b mRNA Bande in B16F1 Zellen läßt vermuten, daß das MUC18 Gen über die Spezies Mensch hinaus konserviert vorliegt, auch wenn einzelne durch die MoAk MUC18 und MUCBA18.1-18.5 definierte Epitope nicht exprimiert werden.

Alle anderen getesteten Zelllinien waren negativ sowohl für die Expression des MUC18 Glykoproteins als auch für die der 3.303bp mRNA (Abbildung 10).

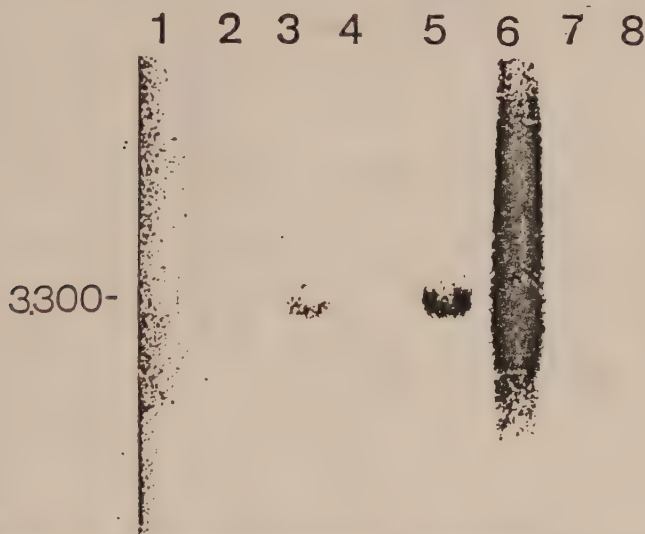


Abbildung 10: Northern blot Analysen unter Verwendung von 20µg Gesamt-RNS und die [32 P] markierten MUC18 cDNA Probe. 1,SK-N-MC; 2,SK-N-SH; 3,HT29; 4,DLD-1; 5,SKBr3; 6,U937; 7,Jurkat; 8,Molt4;

Für die Southern blot Analysen (Abbildung 11) wurden die [32 P] markierte MUC18 cDNA Probe und genomische DNA von Mel JuSo Zellen verwendet. Da sich beim Verdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen nur ein einzelnes Hybridisierungsfragment zeigte, liegt das MUC18 Gen vermutlich als einzelne Kopie im Genom vor. Ein Vergleich des Restriktionschnittmusters von peripheren Blutlymphozyten, autologen B lymphoblastoiden- und Melanom Zelllinien ergab keinen Anhalts-

punkt auf ein in Melanomen rearrangiertes Gen oder einen Polymorphismus bei den bisher untersuchten Personen.

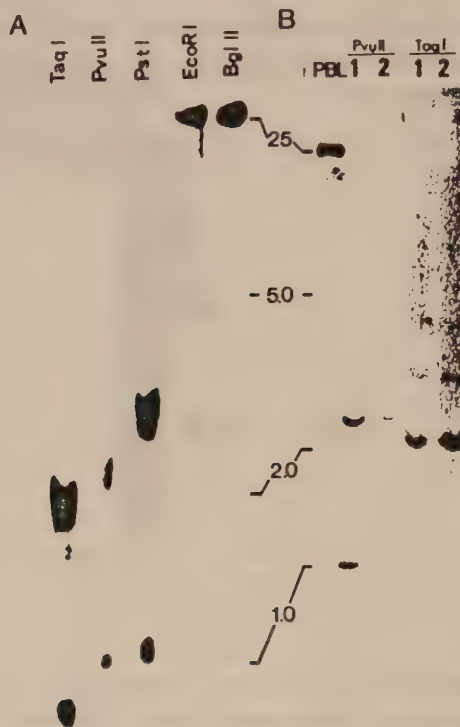


Abbildung 11: Southern blot Analysen. A, Genomische DNS von Mel JuSo Zellen wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut. B, Genomische DNS von PBL mit EcoRI verdaut; Genomische DNS von Mel Ho Zellen (Spur1) und deren autologer B lymphoblastoider Zelllinie (Spur2) wurden mit den Restriktionsendonukleasen PvuII und TaqI verdaut. Zur Hybridisierung wurde jeweils die [32 P] markierte MUC18 cDNS Probe verwendet.

Nukleotid- und Aminosäuresequenz des MUC18 Glykoproteins

Nach der Umklonierung in den Expressionsvektor pUC18 wurde die cDNS-Sequenz mittels der Kettenabbruch Methode bestimmt. Viele Regionen wurden gleichzeitig in mehreren der Klone sequenziert, und ein Großteil der Sequenz wurde für beide Orientierungen bestimmt (Abbildung 8).

Die cDNS Sequenz (Abbildung 12) enthält einen 7bp langen 5'untranslatierten Bereich, einen offenen Leserahmen von 1.809bp und eine 1.487bp lange 3'untranslatierte Region. Diese enthält an Position 3.264 das konsensus Polyadenylierungssignal (AATAAA), welchem im Abstand von 15 Basen der poly(A)Schwanz folgt.

Im Unterschied zu dieser Nukleotidsequenz enthält der cDNS Klon Drop4.7 eine nicht verwandte 92bp lange 3'untranslatierte Region, die von Position 2.847 ihren Ausgang nimmt, und möglicherweise durch alternatives RNS-splicing entstanden ist. Ein konsensus Polyadenylierungssignal ist in dieser Sequenz nicht vorhanden, dennoch endet die cDNS, vermutlich eher zufällig mit einem Abschnitt von 8 Adenosinnukleotiden. Möglicherweise hat sich der für die cDNS-Synthese verwendete oligo(dt)Primer an diese Region, statt wie beabsichtigt, an den poly(A)Schwanz angeheftet. Das Fehlen einer zweiten Bande im Northern blot (Abbildung 9) deutet auf zwei nahezu gleichgroße mRNS Species hin. Demzufolge sollten dem Klon Drop4.7 zum korrekten 3'Ende noch ungefähr 350 Nukleotide fehlen. Das Vorhandensein zweier in ihren 3'untranslatierten Regionen divergierender mRNS läßt auf eine durch unterschiedliche biologische Halbwertszeit hervorgerufene posttranscriptionelle Regulation des MUC18 Gens schließen (Shaw and Kamen,1986). Diese Vermutung bedarf jedoch noch der Bestätigung durch die Isolierung weiterer Klone, die das 3' Ende vom drop4.7 enthalten, um so ein möglichen Klonierungsartefakt ausschließen zu können.

Als Translationsstartkodon wurde das erste ATG des offenen Leserahmens an Position 1 aufgrund der ihn umgebenden Nukleotide (GGAAGCATGG) bestimmt (Kozak,1987).

Die Hydrophobizitätsanalyse (Kyte and Doolittle,1982) des Übersetzten Proteins (Abbildung 13) zeigt, daß dem Startkodon

[illegible]

Abbildung 12: DNS Sequenz und vermeintliche Aminosäuresequenz von MUC18. Die Nukleotidsequenz von MUC18 wurde so nummeriert, daß +1 die Translationsstartstelle ist. Die Aminosäuresequenz wurde ausgehend vom Start-Methionin (+1) nummeriert. Die voraussichtliche Signalpeptidsequenz wie auch die Transmembranregion sind unterstrichen. Mögliche N-Linked Glykosylierungsstellen sind durch einen Stern gekennzeichnet. Das Polyadenylierungssignal an Position 3.264 ist doppelt unterstrichen.

KD-Hydrophobicity >1.3
KD-Hydrophobicity >1.3

22-SEP-1988 12:04

>P1: MUC18PRT

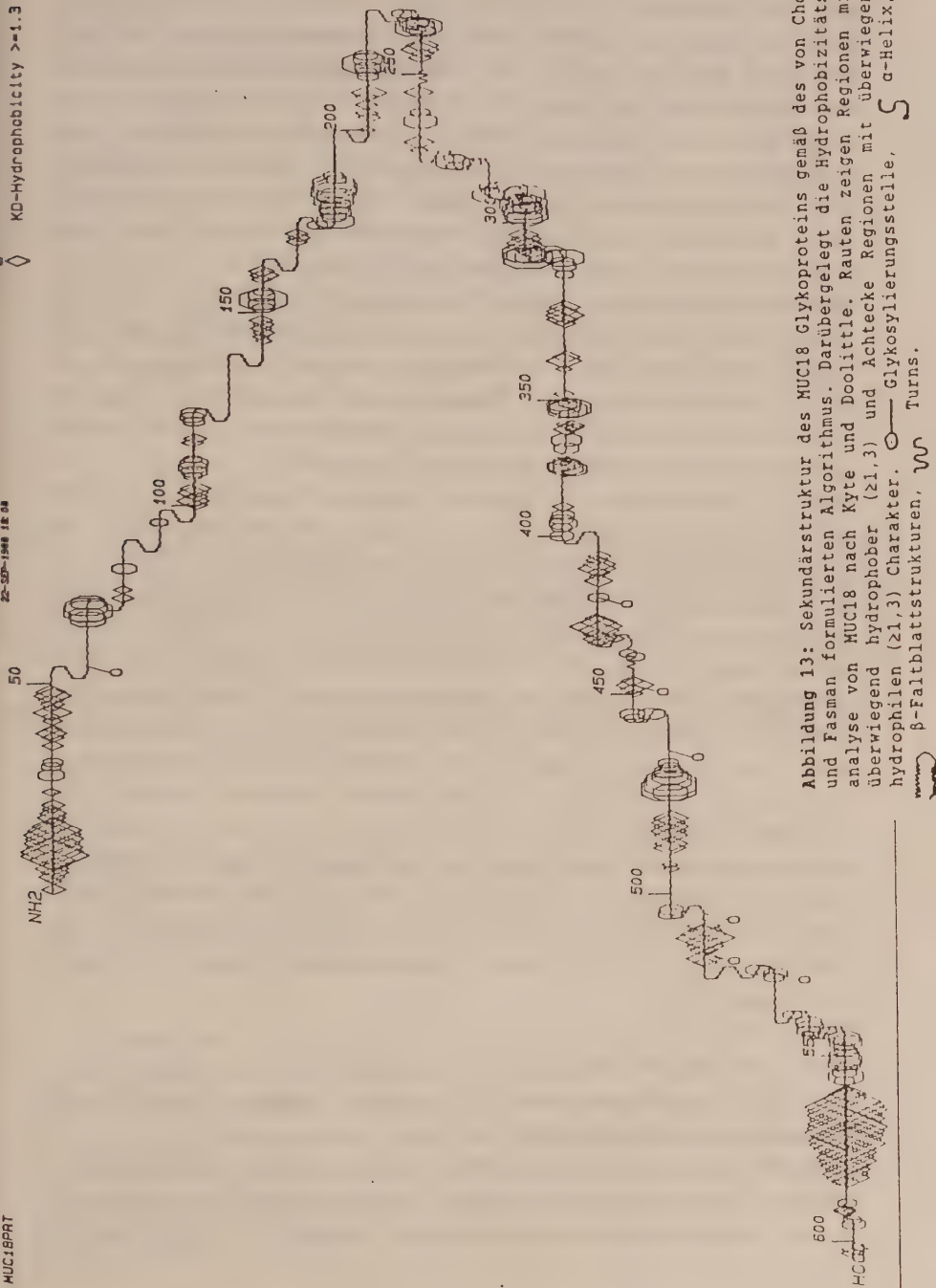


Abbildung 13: Sekundärstruktur des MUC18 Glykoproteins gemäß des von Chou und Fasman formulierten Algorithmus. Darübergelegt die Hydrophobizitätsanalyse von MUC18 nach Kyte und Doolittle. Rauten zeigen Regionen mit überwiegend hydrophober (21,3) und Achtecke Regionen mit überwiegend hydrophilen (21,3) Charakter. $\bigcirc$ Glykosylierungsstelle, α -Helix, β -Faltblattstrukturen, $\cup$ Turns.

eine 28 Aminosäuren lange Signalpeptidsequenz folgt, die vermutlich zwischen dem Alanin 28 und Glutaminsäure 29 abgespalten wird (Heijne, 1986). Die Signalpeptidsequenz erlaubt es sekretorischen Proteinen in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums einzudringen, eine Voraussetzung dafür, daß das Protein auf die Oberfläche gelangen kann. Der charakteristische Aufbau einer solchen Sequenz besteht aus einer N-terminalen basischen Region, einer zentralen hydrophoben und einer mehr polaren C-terminalen Region (Heijne, 1985).

Der offene Leserahmen endet mit dem Stopkodon TAA an Position 1.810. Das MUC18 Glykoprotein besteht demzufolge aus 575 Aminosäuren, was einem kalkulierten Molekulargewicht von Mr 63.195 Dalton entspricht. Dieses stimmt hervorragend mit dem nach Glycopeptidase F Behandlung beobachteten anscheinenden Molekulargewicht von 65.000 Dalton überein.

Die in Aminosäuren überführte Sequenz enthält noch einen weiteren hydrophoben Abschnitt von 24 Aminosäuren, der charakteristisch für eine Transmembrandomäne ist.

Die für eine mögliche Asparagin gebundene Glykosylierung beschriebene Konsensussequenz (Asn-Xaa-Ser/Thr) tritt in der extrazellulären Region des Moleküls neunmal auf. Diese neun möglichen Zuckerketten und die darüberhinaus noch bestehende Möglichkeit einer O-linked Glykosylierung sollten ausreichend sein, um ein Protein von 63.195 Daltons so zu glykosylieren, daß es das für MUC18 beschriebene Molekulargewicht von 113.000 Dalton erreicht.

Nach dem von Chou und Fasman (1974) formulierten Algorithmus, der eine ungefähre Vorraussage der Sekundärstruktur eines Proteins erlaubt, setzt sich das MUC18 Glykoprotein zum überwiegenden Teil aus β -Faltblattstrukturen zusammen (Abbildung 13).

Das MUC18 Glykoprotein ist ein neues Mitglied der Immunglobulin Supergenfamilie

Die MUC18 Glykoprotein Sequenz erfüllt die Grundbedingungen, die mit einer Mitgliedschaft in der Immunglobulin Supergenfamilie verknüpft sind (Williams and Barclay, 1988). Der gesamte

extrazelluläre Anteil von MUC18 besteht aus fünf Domänen, die alle, sowohl zueinander als auch zu beschriebenen Immunglobulinähnlichen Domänen, homolog sind. Eine Immunglobulin Domäne ist gekennzeichnet durch eine ungefähre Größe 100 Aminosäuren, durch eine überwiegend aus β -Faltblättern bestehende und sich daraus ergebende globuläre dreidimensionale Struktur, die durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten wird.

Abbildung 14 zeigt das mittels Augenmaß durchgeführte Angleichen der fünf MUC18-Domänen mit jeweils zwei der entsprechenden Domänen vom Neural cellular adhesion molecule (N-CAM, Cunningham et al., 1987) und vom Myelin associated glycoprotein (MAG, Salzer et al., 1987).

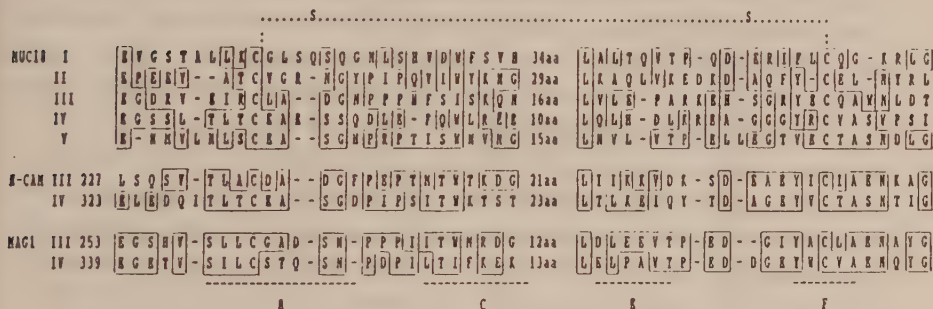


Abbildung 14: Sequenzvergleich von MUC18 Sequenzen, die um die konservierten Cysteine liegen und an der Bildung der Immunglobulinomäne beteiligt sind, mit den entsprechenden Regionen von NCAM und MAG. Eingekastete Aminosäuren sind in zwei oder mehr Sequenzen enthalten. Das Angleichen der Sequenzen wurde mittels Augenmaß durchgeführt, wobei das Einfügen von Lücken, um die Ähnlichkeit zu optimieren auf ein Minimum reduziert wurde.

Ein Sequenzvergleich gegen die MIPSZ (Ausgabe 9) Proteinsequenz Datenbank (F.Pfeiffer, persönliche Mitteilung) unter Verwendung des FASTP Programs (Lipman and Pearson, 1985) fand keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Proteinen außerhalb der Immunglobulin Supergenfamilie. Zu den Mitgliedern innerhalb dieser Genfamilie war die Ähnlichkeit besonders ausgeprägt zum humanen carcinoembryonic antigen (CEA, Oikawa et

al.,1987), zum N-CAM und MAG. Der Bereich der Aminosäuren 57-408, der den Domänen 1-4 von MUC18 entspricht, zeigte eine 21,8% Identität zum MAG, während der Bereich der Aminosäuren 186-474 eine 20,2% Identität zum CEA und der Bereich der Aminosäuren 388-515 eine 25,5% Identität zum N-CAM zeigte. Kürzlich konnte für vier weitere Moleküle, mit Funktionen in der Zell-Zell Interaktion von Neuralgewebe, eine Mitgliedschaft zur Immunglobulin Supergenfamilie aufgezeigt werden. Es handelt sich bei diesen um das aus Grashüpfern isolierte Fasciclin (Harrelson and Goodman,1988), um das aus *Drosophila melanogaster* isolierte Amalgam (Seeger et al.,1988), und um die beiden humanen neuronalen Adhäsionsmoleküle L1 (Moos et al.,1988) und Contactin (Ranscht and Dours,1988). Die Sequenzähnlichkeit bewegt sich im für Mitglieder der Immunglobulin Supergenfamilie üblichen Rahmen, und beträgt zum Fasciclin 16,2% Identität über einen Bereich von 229 Aminosäuren, zum Amalgam 26% Identität über 168 Aminosäuren, zum L1 22,6% Identität über 288 Aminosäuren und zum Contactin 22,2% Identität über 117 Aminosäuren.

Weniger stark ausgeprägt ist die Beziehung zu den anderen Mitgliedern dieser Genfamilie, zu denen meist nur einige, der um jeweils eines der beiden konservierten Cysteine gelegenen Aminosäuren, identisch waren. Hierzu gehören die H-2 Klasse II Moleküle, die v-Regionen von Immunglobulinen, das T-Zell Oberflächen Glykoprotein CD8, die T-Zell Rezeptor alpha und beta Ketten und die Fc-Rezeptoren.

Die Immunglobulin Domänen I und II des MUC18 Glykoproteins haben den Charakter von V-Domänen, während die Domänen III-V den C2-set-Sequenzen zugerechnet werden müssen.

Der Hauptunterschied zwischen diesen beiden Domänenstrukturen besteht in einem zusätzlichen Sequenzabschnitt zwischen den β -Faltblattstrukturen c und d, durch den in den Immunglobulinen die hypervariable Region der Antigenbindungsstelle geformt wird. Der Abstand zwischen den beiden Cysteinen beträgt in den V-Domänen des MUC18 Glykoproteins 67 und 61 Aminosäuren gegenüber einem Abstand von 41-46 Aminosäuren in den C2-set-Domänen.

Ein Hauptcharakteristikum dieser Domänen ist die Disulfid-

brücke zwischen den β -Faltblattstrukturabschnitten b und f. Die bereits weiter oben erwähnte Reduktion des scheinbaren Molekulargewichtes von MUC18 von 113.000 Dalton unter reduzierenden Bedingungen, auf 100.000 Dalton unter nicht reduzierenden Bedingungen, läßt vermuten, daß diese Disulfidbrücken im MUC18 Glykoprotein tatsächlich geschlossen sind. Für die räumliche Konfiguration dieser Domänen sind darüberhinaus auch einige konservierte Aminosäuren in der näheren Umgebung der beiden Cysteine von Bedeutung. Eine schematische Darstellung der vermutlichen Sekundärstruktur von MUC18 und den nah verwandten neuronalen Adhäsionsmolekülen MAG, N-CAM, L1, Amalgam und Fasciclin II werden in Abbildung 15 gezeigt.

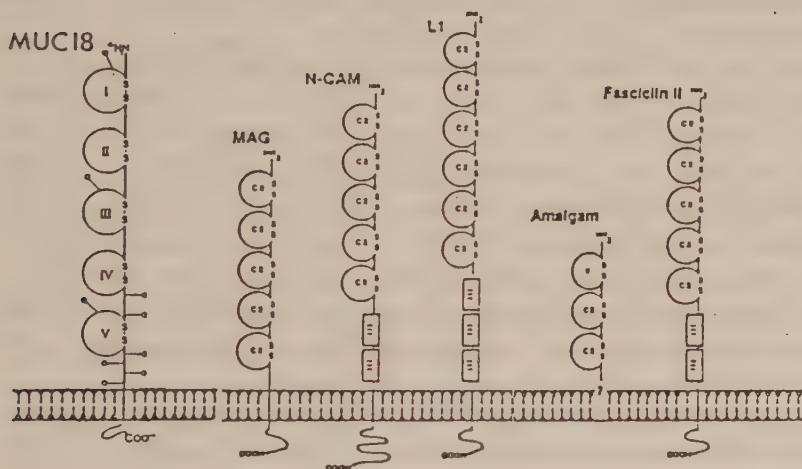


Abbildung 15: schematische Darstellung der vorraussichtlichen Sekundärstruktur des MUC18 Glykoproteins und einiger verwandter Moleküle der Immunglobulin Supergenfamilie. Die Kastensymbole mit dem III stehen für Fibronektin Typ III Domänen.

Die funktionelle Bedeutung der Immunglobulin Domäne ist bis heute im Detail noch nicht geklärt, doch wird vermutet, daß die dreidimensionalen Struktur der Grund dafür ist, daß es häufig zu einer Interaktion von Mitgliedern dieser Familie kommt. So binden z.B. MHC Klasse I und CD1 Moleküle das β_2 -

Mikroglobulin, die Immunglobuline interagieren mit Fc-Rezeptoren, das LFA-3 mit dem CD2 und N-CAM in homophilerweise mit einem anderen N-CAM Molekül (Anderson et al., 1988). Darüberhinaus sollte die kompakte globuläre Sandwichstruktur, die sich aus den anti-parallelen β -Faltblättern aufbaut und durch die Disulfidbrücke zusammengehalten wird, dazu führen, daß diese Moleküle, die zum überwiegenden Teil auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, resistenter gegenüber einer proteolytischen Spaltung durch Proteasen sind. Dieses und die dreidimensionale Struktur ermöglichen es den Mitgliedern der Immunglobulin Supergenfamilie als ein Rezeptor lösliche oder zellgebundene Faktoren zu binden, und dadurch eine Funktion in der Kontrolle von Zellbewegung oder Zelldifferenzierung auszuüben.

Obwohl ein möglicher Ligand nicht beschrieben und eine zelluläre Funktion für das MUC18 Glykoprotein nicht beschrieben werden konnte, ist doch der hohe Grad an Ähnlichkeit zum N-CAM und MAG von besonderem Interesse, seitdem für beide Moleküle gezeigt werden konnte, daß sie Zell-Zell Adhäsion von neuronalen Zellen vermitteln.

Wie CEA, werden auch N-CAM und MAG im Verlauf der Gewebsentwicklung unterschiedlich reguliert, N-CAM während der Bildung des Nervensystems und MAG beim Aufbau der Myelinscheide von Nervenfasern.

Die Beobachtung, daß das MUC18 Glykoprotein als ein normaler Bestandteil von Muskelzellen der Blutgefäße exprimiert wird, könnte auf eine vergleichbare Adhäsionsfunktion bei der Bildung des Gefäßsystems hindeuten. Die nachgewiesene Korrelation zwischen der Expression von MUC18 durch Melanomzellen und der Tumorprogression läßt ferner vermuten, daß das MUC18 Glykoprotein Melanomzellen in einem frühen Stadium des Tumorwachstums mit einer Fähigkeit ausstattet, die bei der späteren Metastasierung einen Beitrag leistet. Dieser könnte darin bestehen, daß mittels der durch MUC18 vermittelten Adhäsionsfunktion es den Melanomzellen ermöglicht wird in bzw. aus der Blutzirkulation zu gelangen.

Modul18, ein neues Protein mit Sequenzähnlichkeit zu src-verwandten Tyrosinkinasen

Durch Kreuzreaktivität, der mit dem denaturiertem MUC18 Glykoprotein reagierenden Antikörper MUCBA18.1, MUCBA18.3 und MUCBA18.5, wurde noch ein weiteres Protein aus der humanen Melanom cDNS Expressions-Genbank isoliert. Dieses vom cDNS Klon Drop6 kodierte, und im weiteren Verlauf als Modul18 bezeichnete Protein, zeigte überraschenderweise keine Sequenzhomologie zum MUC18. Auch durch Anwendung des ALIGN Programs von Dayhoff et al., 1983, konnte keine über einen statistischen Zufall hinausgehende Homologie aufgezeigt werden.

Auch auf Nukleotidebene zeigte sich keine Sequenzähnlichkeit zur Nukleotidsequenz des MUC18 Glykoproteins, die zu einer Kreuzhybridisierung führen könnte.

Modul18 mRNA und genomische DNS

Da mangels eines Modul18 spezifischen Antikörpers, ein Verteilungsmuster in Geweben nicht untersucht werden konnte, wurden Northern blot Analysen durchgeführt. Dazu wurde eine [³²P] markierte Modul18 cDNS-Probe mit Gesamt-RNS einer Vielzahl histogenetisch unterschiedlicher Zelllinien hybridisiert. Eine einzelne ungefähr 2100b große mRNA, wurde von der überwiegenden Zahl der getesteten Zelllinien mehr oder weniger stark exprimiert. Die Größe dieser mRNA-Bande entspricht annähernd der des cDNS-Klones drop6, so daß dieser voraussichtlich die gesamte Sequenzinformation für Modul18 enthält. Ein gravierender quantitativer Unterschied in der Expression der 2100b mRNA-Bande, wie er durch eine Genamplifikation hervorgerufen worden sein könnte, war nicht erkennbar (Abbildung 16). Die Expression des Modul18 Proteins in einer Vielzahl von histogenetisch unterschiedlichen Zelllinien läßt auf eine eher allgemeine Funktion schließen.

Für die Southern blot Analysen (Abbildung 17) wurden eine [³²P] markierte Modul18 cDNS-Probe und genomische DNS von Mel JuSo Zellen verwendet. Da sich beim Verdau mit verschiedenen

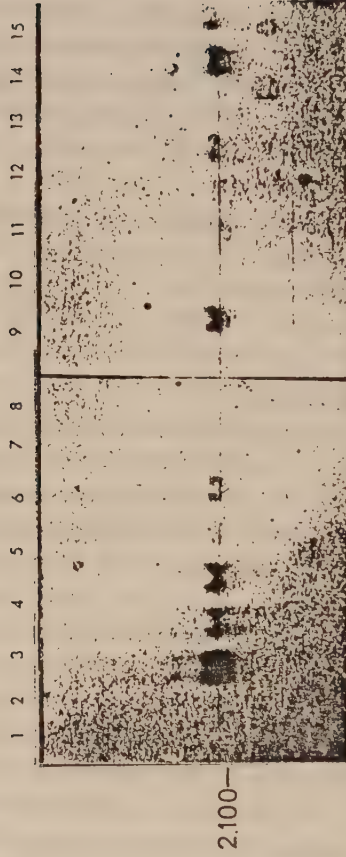


Abbildung 16: Northern blot Analysen unter Verwendung von 20µg Gesamt-RNS und einer [32 P] markierten Modull18 cDNS Probe. 1, Mel JuSo; 2, SkMel28; 3, SkMel1; 4, SkMel25; 5, A375; 6, B16F1; 7, HeLa; 8, SK-N-MC; 9, SK-N-SH; 10, HT29; 11, DLD-1; 12, SkBr3; 13, U937; 14, Jurkat; 15, Molt4;

<u>Pvu II</u>		<u>Bgl II</u>		<u>EcoRI</u>	
1	2	1	2	1	2



Abbildung 17: Southern blot Analysen von Modul18. Genomische DNS von Mel JuSo Zellen *Spur 1* und autologen B-lymphoblastoiden Zellen *Spur 2* wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut und mit der [P^{32}] markierten Modul18 cDNS Probe hybridisiert. B,

Restriktionendonukleasen nur ein einzelnes Hybridisierungsfragment zeigte, liegt das Modul18 Gen vermutlich als einzelne Kopie im Genom vor. Ein Vergleich des Restriktionschnittmusters von peripheren Blutlymphozyten, autologen B lymphoblastoiden- und Melanom Zelllinien ergab keinen Anhaltspunkt auf ein in Melanomen rearrangiertes Gen oder auf einen Polymorphismus innerhalb des untersuchten Personenkreises.

Sowohl im Northern als auch im Southern blot zeigte sich keine zweites 'Bandemuster', welches von einer Kreuzhybridisierung mit MUC18 herrühren könnte. Die Hybridisierung im Plasmid-blot ist somit aller vorraussicht nach, trotz der stringenten Hybridisierungsbedingungen, ein Artefact.

Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Modul 18 Proteins

Nach der Umklonierung in den Expressionsvektor pUC18 wurde die cDNS-Sequenz mittels der Kettenabbruchmethode bestimmt. Ein Großteil der Sequenz wurde dabei in beiden Orientierungen sequenziert (Abbildung 18).

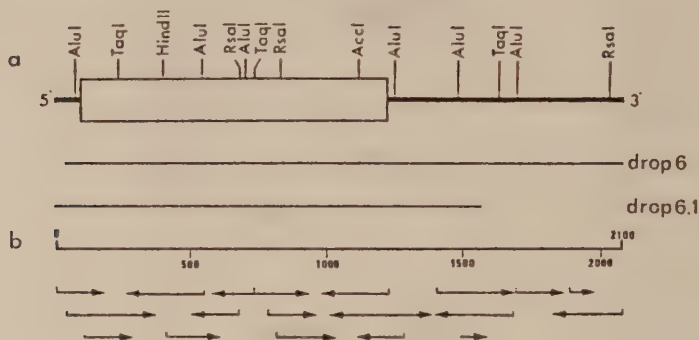


Abbildung 18: a, Schematische Darstellung der Modul18 cDNS, der zur Sequenzierung verwendeten Restriktionsschnittstellen und der Lage der cDNS Klone zueinander; b, Sequenzierungsstrategie

Die cDNS-Sequenz (Abbildung 19) enthält einen 101bp 5'untranslatierten Bereich, einen offenen Leserahmen von 1131bp und eine ≈ 850 bp lange 3'untranslatierte Region. Diese enthält das konsensus Polyadenylierungssignal (AATAAA), dem im Abstand von 21 Basen der poly(A)Schwanz folgt.

Chou-Fasman prediction

22-SEP-1968 18:47

○ KO-Hydrophilicity >+1.3
◇ KO-Hydrophobicity >+1.3

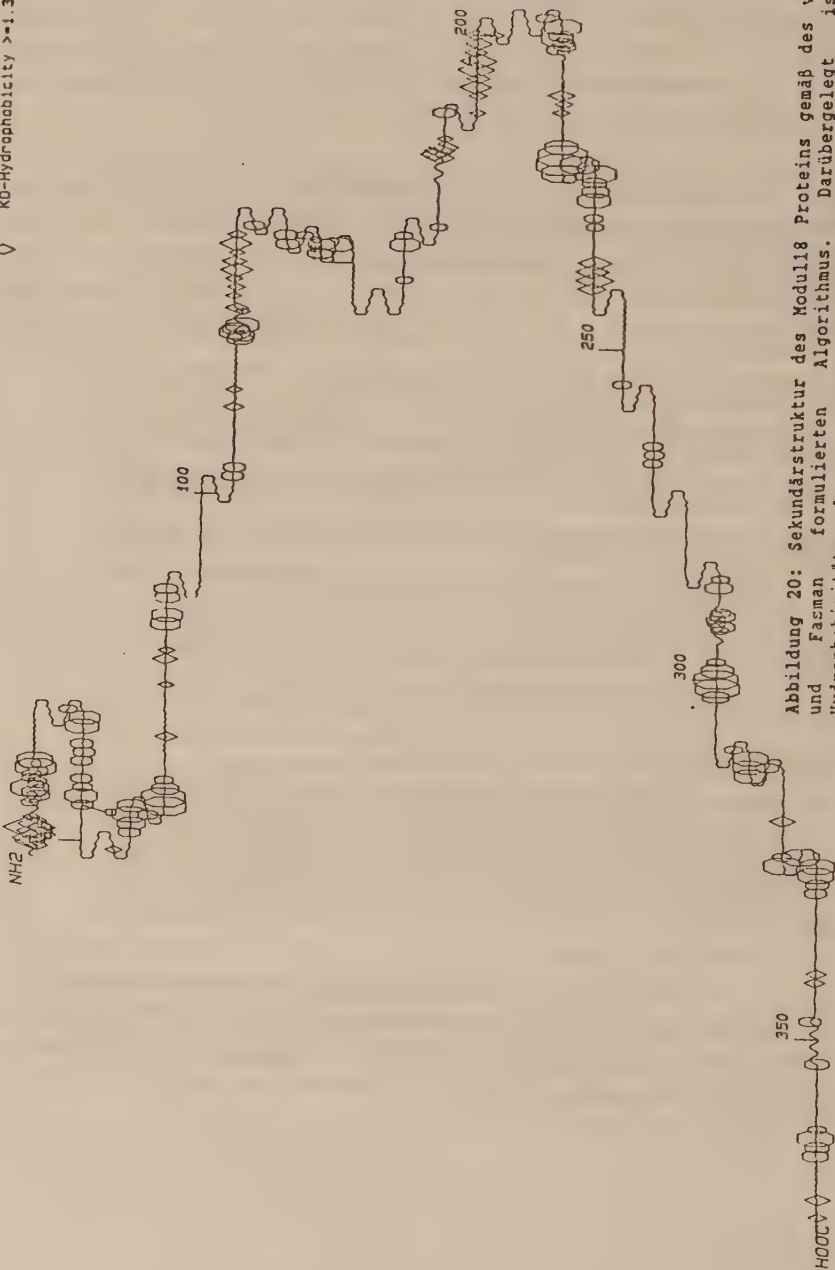


Abbildung 20: Sekundärstruktur des Modu18 Proteins gemäß des von Chou und Fasman formulierten Algorithmus. Darübergelegt ist die Hydrophobizitätsanalyse von Modu18 nach Kyte and Doolittle. Rauten zeigen Regionen mit überwiegend hydrophoben ($\geq 1,3$) und Achtecke mit überwiegend hydrophilen ($\geq 1,3$) Charakter. ○ — Glykosylierungsstelle.

Als Translationsstartkodon wurde das erste ATG des offenen Leserahmens an Position +1 aufgrund der ihn umgebenden Nukleotidsequenz (TGAAAGATGG) bestimmt (Kozak,1987).

Die Hydrophobizitätsanalyse der Proteinsequenz (Kyte and Doolittle,1982) ließ weder eine Signalpeptidsequenz noch eine Transmembran-Domäne erkennen (Abbildung 20). Eine sich N-terminal befindliche hydrophobe Region könnte jedoch dazu dienen, Modul18 auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran zu verankern.

Auch das Vorhandensein nur einer Konsensussequenz (Asn-Xaa-Ser/Thr) für eine mögliche Asparagin gebundene Glykosylierung scheint diese Hypothese zu bestätigen.

Der offene Leserahmen endet mit einem Stopkodon TGA an Position 1233. Demnach dürfte das Modul18 Protein aus 377 Aminosäuren bestehen, und ein Molekulargewicht von Mr 42.540 Dalton besitzen.

Modul18 zeigt Sequenzähnlichkeit zur nicht-katalytischen Domäne der src-verwandten Tyrosinkinasen

Ein Vergleich der Modul18-Sequenz mit der MIPSZ (Ausgabe 9) Proteinsequenz Datenbank (F.Pfeiffer, persönliche Mitteilung) unter Verwendung des FASTP Programs (Lipman and Pearson,1985) ergab eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit zu den Tyrosinkinasen der Nicht-Rezeptor Klasse (dem Onkogen src verwandte Tyrosinkinasen).

Domäne	Region (Aminosäure)	Identität [%]	Produkt	Literaturstelle
A	9-58	38	pp60 c-src chicken	Takeva&Hanafusa,1983
A'	112-160	44	Phospholipase C	Stahl et al.,1988
A''	196-248	35	Dsrc64	Simon et al.,1985
		36	v-crk	Mayer et al.,1988
		35	human lyn	Yamanashi et al.,1987
B	281-323	33	src	Anderson et al.,1985
		33	fgr	Nishizawa et al.,1986
C	346-358	37	abl	Shtivelman et al.1986
		32	yes	Roebroek et al.,1985

Tabelle 8: Sequenzähnlichkeit von Modul18 mit Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen.

Drei Regionen innerhalb von Modul18, die eine ungefähre Größe von 50 Aminosäuren aufweisen, sind außerdem zueinander homolog (Tabelle 8).

Weitere Sequenzähnlichkeit zu anderen Proteinen ließen sich nicht nachweisen, abgesehen von kurzen Sequenzabschnitten in denen einige wenige Aminosäuren übereinstimmen.

Die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen enthalten neben der sich im C-terminalen Anteil befindlichen hoch konservierten katalytischen Domäne (Hanks et al.,1988) eine weitere N-terminal gelegene konservierte Region (Sadowski et al.,1986). Diese als nicht-katalytische Domäne oder SH2 bezeichnete Region setzt sich aus den drei Sequenzabschnitten A,B und C zusammen und umfaßt ungefähr 100 Aminosäuren.

Modul18 A	A K F D I T A Q Q - K Q E L - D I K E - - N E R L V L L D D S K S V V P Y R N S H N E T G E V P S N Y T E
A'	V K F N T N A E R - E D E L S L I K C - - T X V Y V H E K C S D G V N R G S I T - N C Q V G W P P S N Y T T
A''	T P E S S S N - - D E - E L N F E K G D V H D V E K P R N D P F W V K C K I L N G N Y C L V P R N Y T T
PLC-II	A L F D I K A C K E D E D L - F T E L S - - A I I O N Y E K O B G C V V K C D I G C A T C L W P P S N Y T E
crk	A L P D F K I C N D D G D - L P F K K A - - D I L K I R D E P E C Q V N A R G N D G F R I C H I P V P Y V E
Modul18 BC	D I P S L T G K F A G N H T C A T T N C A E H A L N E R C H E D F I P S E S S H D F S I H E - - A D E - N R N P V O L - K E T V Y L C G P - F E S T N E E L V R C F I
abl	L Y I T H - V Y S I E R H S V I A P V S P H A G - Q L L S - G I K G E L V R S E S S P O V E S U R - - I E R - Y T H A Q I A Q K L N Y S S E S - R F N T L N L Y L N G S T
fgr	N Y V A P - V S I Q A E E V T F G I G R D A E R Q L L S P G H A G F L V R S E T T G A I S L I R U N D E A P G D V N H K I R L I - D P G Y I T T R A Q F S V O B L V C H T V E
yes	N Y V A P - D S I Q A E E V T F G I G R D A E R Q L L N P G H A G F L V R S E T T G A I S L I R U N D E A P G D V N H K I R L I - D P G Y I T T R A Q F S L Q K L Y S K E I
src	N Y V A P - D S I Q A E E V T F G I T R E S E R L L N H P G H A G F L V R S E T T G A I S L I R U N D E A P G D V N H K I R L I - D S C F F T I S G I T S S L Q L Y A T S I

Abbildung 21: Sequenzvergleich von Modul18 mit den entsprechenden Regionen der Onkogene abl, fgr, yes und src. Eingekastete Aminosäuren sind in zwei oder mehr Sequenzen enthalten. Das Angleichen der Sequenzen erfolgte mittels Augenmaß, wobei das Einfügen von Lücken, um die Homologie zu erhöhen, auf ein Minimum reduziert wurde.

Abbildung 21 stellt den Versuch dar, mittels Augenmaß die homologen Sequenzabschnitte von Modul18 mit den der nicht-katalytischen Domäne anzugleichen.

Durch Mutationen im N-terminalen Bereich des Onkogenes fgr konnte gezeigt werden, daß diese Region nicht unmittelbar für

die katalytische Tyrosinkinaseaktivität benötigt wird, jedoch entscheidend für die transformierende Aktivität von v-fgr ist, da es die Enzymaktivität direkt oder indirekt moduliert (Sadowski et al., 1986).

Für zwei Proteine, Phospholipase C (Stahl et al., 1988) und das transformierende Genprodukt crk des Hühner Sarkom Virus CT10 (Mayer et al., 1988), konnte kürzlich gezeigt werden, daß sie, ebenso wie Modul18 Ähnlichkeit zu dieser nicht-katalytischen Domäne aufweisen, ohne selbst eine Tyrosinkinaseaktivität zu besitzen. Beiden Proteinen ist gemeinsam, daß die entsprechend Domäne nicht den klassischen Aufbau von src hat, sondern daß die Sequenzabschnitte A,B und C in ihrer Lage zueinander verändert oder in duplizierter Form vorliegen (Abbildung 22).

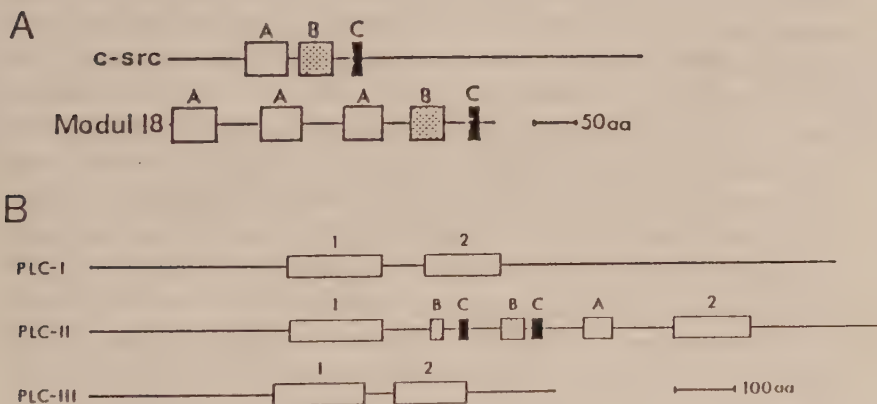


Abbildung 22: A, Schematische Darstellung der nicht-katalytischen Domäne von Modul18 und src. B, Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PLC-I,II,III. Die mit A,B,C bezeichneten homologen Abschnitte kennzeichnen die Lage der nicht-katalytischen Domäne, 1 und 2 bezeichnen zwei homologe Regionen von 150 bzw. 120 Aminosäuren in Phospholipase C, die vermutlich funktionelle Domänen darstellen.

Die phosphoinositol-spezifische Phospholipase C übt eine Schlüsselfunktion in der Übermittlung extrazellulärer Signale an den Zellkern aus, indem sie durch hydrolytische

Spaltung von Phosphoinositolbiphosphat ($\text{PtdIns}[4,5]\text{P}_2$) die intrazellulären sogenannten second messenger Diacylglycerol (DG) und Inositol 1,4,5, triphosphat ($\text{Ins}1,4,5,\text{P}_3$) freisetzt. DG verbleibt in der Plasmamembran und aktiviert im Zusammenspiel mit Kalzium die Proteinkinase C, welche ihrerseits durch die spezifische Phosphorylierung von Proteinen, das Signal an den Zellkern weitervermittelt. Die Funktionsweise von $\text{Ins}1,4,5,\text{P}_3$ als second messenger besteht in der Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Abbildung 23).

Ähnlich wie bei der Signalübertragung auf den second messenger cAMP durch die Aktivierung der Adenylat-Cyclase, ist die rezeptorvermittelte Hydrolyse von Phosphoinositolbiphosphat durch Phospholipase C an ein Guaninnukleotid-bindungsprotein (G_p -Protein) gekoppelt (Cockcroft, 1987; Gilman, 1987).

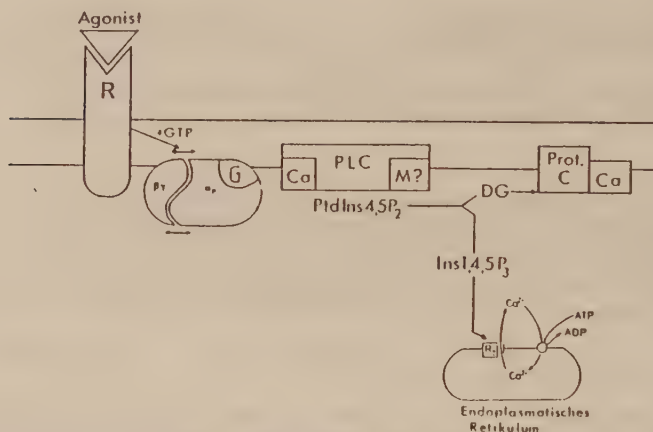


Abbildung 23: Modell der Signalübermittlung durch das second messenger System InsP_3 und DG. Durch die Bindung eines Agonisten an seinen Rezeptor (R) wird ein G-Protein (G_p) aktiviert, indem die Bindung von GTP an die α -Untereinheit katalysiert wird. Die dadurch abgespaltene α -Untereinheit stimuliert die Phospholipase C, die daraufhin Phosphatidylinositol 4,5 biphosphat in die second messenger InsP_3 und DG spaltet. Es wird spekuliert, daß dieser Vorgang durch eine modulatorische Einheit (M) reguliert wird.

InsP_3 diffundiert in das Zytosol und setzt nach Bindung an einen Rezeptor Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum frei. DG verbleibt in der Plasmamembran und aktiviert dort die Proteinkinase C.

Die Existenz eines solchen G_p -Protein wurde aufgrund der Tatsache postuliert werden, daß durch die Gabe des Aluminiumkomplexes (AlF_4)- die Phospholipaseaktivität stimuliert werden kann. (AlF_4)- täuscht die Bindung von GTP an das G-Protein vor, kann aber nicht durch die GTPase wieder abgespalten werden, sodaß das G-Protein ständig in seiner aktivierten Form vorliegt. (Gilman, 1987). Als ein möglicher Kandidat für ein solches G_p -Protein wird das ras Onkogenprodukt p21. In NIH 3T3 Zellen, die mit p21^{ras} transformiert wurden, ist die Konzentration an $Ins1,4,5, P_3$ nach Zugabe von Wachstumsfaktoren, insbesondere von Bombesin, stark erhöht (Barbacid, 1987). Ein inhibitorisches G-Protein, das ähnlich wie G_i die Aktivität der Adenylat-Cyclase hemmt, konnte für Regulation der Phospholipase C bisher ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Berridge, 1987).

Aus Rinderhirn konnten kürzlich drei Phospholipase C Isoenzyme (PLC-I, II, III) isoliert werden, die sich immunologisch und aufgrund ihres Molekulargewichtes eindeutig unterscheiden lassen (Ryu et al., 1988; Suh et al., 1988). Durch Sequenzvergleich dieser drei Isoenzyme ließen sich zwei distinkte homologe Regionen von 150 und 120 Aminosäuren identifizieren, die möglicherweise für die katalytischen Funktionen (d.h. Erkennung von Phosphoinosiden, Hydrolyse der Phosphodiesterbindung, Interaktion mit dem G_p -Protein und Ca^{2+} -Bindung) der Phospholipase C verantwortlich sind. Durch Mutagenese Experimente konnte gezeigt werden, daß beide Domänen für die katalytische Aktivität notwendig sind (Bristol et al., 1988). In der PLC-II liegen diese beiden Domänen, durch eine Region mit Sequenzähnlichkeit zur nicht-katalytischen Domäne, getrennt vor (Stahl et al., 1988). Es wird daher derzeit diskutiert, daß die enzymatische Aktivität sowohl von Tyrosinkinasen als auch die der PLC-II durch einem sehr ähnlichen Proteinfaktor moduliert wird. Da PLC-I und PLC-III eine solche regulatorische Einheit nicht enthalten müßte die Modulation ihrer Enzymaktivität über einen anderen Weg ablaufen. Es ist dabei vorstellbar, daß ein Protein, mit den strukturellen Eigenschaften von Modul18 oder crk, quasi als ein Cofaktor die Modulation ausübt.

Wachstumsfaktoren wie der Epidermal growth factor und der Platelet-derived growth factor, verwenden zur Signalübermittlung das Phosphoinositol-second-messenger-System (Berridge and Irvine, 1984). Eine Fehlregulation von Modul18 könnte durch Aktivierung der Phospholipase C einen von einem externen Signal unabhängigen Wachstumsstimulus imitieren, und so ein unkontrolliertes Zellwachstum auslösen und unterhalten.

Noch bleiben zahlreiche Fragen ungeklärt, so z.B. ob in aktivierten Zellen die Modul18-Konzentration erhöht ist, ob die Expression von Modul18 zur Induktion von Tyrosinkinase oder Phospholipase C Aktivität führt, wie ein möglicher Regulationsmechanismus der enzymatischen Aktivität ablaufen könnte, und nicht zuletzt ob die beobachtete Kreuzreaktivität zwischen denaturiertem MUC18 und Modul18 eher zufälliger Natur ist, oder ob eine funktionelle Beziehung zwischen beiden Proteinen besteht.

Literaturverzeichnis

- Ackerman, A.B. & Mihara, I. (1985) Some questions and answers about dysplasia, dysplastic melanocytes, dysplastic nevi, the dysplastic nevus syndrome, and the relationship of dysplastic nevi to malignant melanoma, *Hum.Path.* 16, 87-91
- Anderson, P., Morimoto, C., Breitmeyer, J.B. & Schlossman, S.P. (1988) Regulatory interactions between members of the immunoglobulin superfamily, *Immunol.Today* 9, 199-203
- Anderson, S.K., Gibbs, C.P., Tanaka, A., Kung, H.J. & Fujita, D.J. (1985) Human cellular src gene: nucleotide sequence and derived amino acid sequence of the region coding for the carboxy-terminal two-thirds of pp60c-src, *Mol.Cell.Biol.* 5, 1122-1129
- Atkinson, B., Ernst, C.S., Christ, B.F.D., Ross, A.H., Clark, W.H., Herlyn, M., Herlyn, D., Maul, G., Stepelewski, Z. & Kopowski, H. (1985) Monoclonal antibody to a highly glycosylated protein reacts in fixed tissue with melanoma and other tumors, *Hybridoma* 4, 243-255
- Avin, H. & Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 69, 1408-1412
- Barbacid, M. (1987) ras Genes, *Ann.Rev.Biochem.* 56, 779-827
- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.P. & Ziegler, A. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens - new tools for genetic analysis, *Cell* 14, 9-20
- Berridge, M.J. (1987) Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers, *Ann.Rev.Biochem.* 56, 159-193
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, *Nature* 312, 315-321
- Breslow, A. (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma, *Ann.Surg.* 172, 902-908
- Bristol, A., Hall, S., Stahl, M., Kriz, R.R., Sultzman, L. & Knopf, J. (1988) Domain mapping of PLC-148, *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* 53, in press
- Brown, J.P., Nishiyama, K., Hellström, I. & Hellström, K.B. (1981) Structural characterization of human melanoma-associated antigen p97 with monoclonal antibodies, *J.Immunol.* 127, 539-546
- Brüggen, J. & Sorg, C. (1983) Detection of phenotypic differences on human malignant melanoma lines and their variant sublines with monoclonal antibodies, *Cancer Immunol.Immunother.* 15, 200-205
- Bumol, T.P., Walker, L.B. & Reisfeld, R.A. (1984) Biosynthetic studies of proteoglycans in human melanoma cells with a monoclonal antibody to a core glycoprotein of chondroitin sulfate proteoglycans, *J.Biol.Chem.* 259, 12733-12741
- Caban, L.D., Irie, R.F., Singh, R., Cassidenti, A. & Paulson, J.C. (1982) Identification of a human ectodermal tumor antigen (OPAI-2) as ganglioside GD2, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79, 7629-7633
- Cairns, J. (1975) Mutation, selection and the natural history of cancer, *Nature* 255, 197-200

- Chen, E.Y. & Seeburg, P.H. (1985) Laboratory Methods Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4 Number 2, 165-170
- Cheresh, D.A., Harper, J.R., Schulz, C. & Reisfeld, R.A. (1984) Localization of the gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81, 5767-5771
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, K.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1974) Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheets and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13, 211-245
- Clark, W.H. (1967) A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biological behavior. In: Montagna, W. and Hu, F. eds. Pergamon Press, London
- Clark, W.H., Elder, D.B., Guerry IV, D., Epstein, M.M., Greene, M.H. & Van Horn, M. (1984) A study of tumor progression. The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum.Path.* 15, 1147-1165
- Cockcroft, S. (1987) Polyphosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding protein, G_i, *TIBS* 12, 75-78
- Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R. & Edelman, G.M. (1987) Neural cell adhesion molecule: structures, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799-806
- Dayhoff, M.O., Barker, W.C. & Hunt, L.T. (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Meth.Enzymol.* 91, 524-545
- De Vries, J.E., Keizer, G.D., TeVelde, A.A., Voordouw, A., Ruiter, D.J., Rünke, P., Spits, H. & Figdor, C.G. (1986) Characterization of melanoma-associated surface antigens involved in the adhesion and motility of human melanoma cells. *Int.J.Cancer* 38, 465-473
- Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T.C., Ikeda, H., Oettgen, H.F. & Old, L.J. (1980) Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 77, 6114-6118
- Eisinger, M. & Marko, O. (1982) Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79, 2018-2021
- Elder, D.B., Kraemer, K.H., Greene, M.H., Clark, W.H. & Guerry, D. (1982) The dysplastic nevus syndrome: our definition. *Am.J.Dermatopathol.* 4, 455-462
- Fidler, I.J. & Hart, I.R. (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: Origins and implications. *Science* 217, 998-1003
- Finstad, C.F., Cordon-cardo, C., Bander, N.R., Whitmore, W.F., Melamed, M.R. & Old, L.J. (1985) Specificity analysis of mouse monoclonal antibodies defining cell surface antigens of human renal cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, 2955-2959
- Fossati, G., Taramelli, D., Balsari, A., Bogdanovich, G., Andreola, S. & Parmiani, G. (1984) Primary but not metastatic human melanomas expressing DR antigens stimulate autologous lymphocytes. *Int.J.Cancer* 33, 591-597

- Foulds, L. (1954) The experimental study of tumor progression: A review. *Cancer Res.* 14, 327-339
- Foulds, L. (1975) Neoplastic development. New York: Academic Press
- Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. & Howard, J.C. (1977) Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266, 550-552
- Garrigues, H.J., Tigen, W., Hellström, I., Franke, W. & Hellström, K.E. (1982) Detection of a human melanoma associated antigen p97 in histological sections of primary human melanoma. *Int.J.Cancer* 29, 511-515
- Gilman, A.G. (1987) G proteins, transducers of receptor-generated signals. *Ann.Rev.Biochem.* 56, 615-649
- Gown, A.M., Vogel, A.M., Hoak, D., Gough, P. & McNutt, N.A. (1986) Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am.J.Pathol.* 123, 195-203
- Greene, P.J., Poonian, M.S., Mussbaum, A.L., Tobias, L., Garfin, D.E., Boyer, H.W. & Goodman, H.M. (1975) Restriction and modification of a self complementary substrate octa nucleotide containing the EcoRI. *J.Mol.Biol.* 99, 237-244
- Gubler, U. & Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-269
- Baeffner-Cavaillon, M., Cavaillon, J.M. & Szabó, L. (1985) Cellular receptors for endotoxin. In: *Handbook of Endotoxin* Berry L.J.(ed.) Elsevier Science Publishers B.V. 3, 1-24
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988) The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52
- Harrelson, A.L. & Goodman, C.S. (1988) Growth cone guidance in insects: Fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 242, 700-708
- Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690
- Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28, 351-359
- Herlyn, M., Herlyn, D., Elder, D.E., Bondi, E., LaRossa, D., Hamilton, R., Sears, H.F., Balaban, G., Guerry IV, D., Clark, W.H. & Koprowski, H. (1984) Phenotypic characteristics of cells derived from precursors of human melanoma. *Cancer Res.* 43, 5502-5509
- Herlyn, M., Clark, W.H., Rodeck, U., Mancianti, M.L., Jambrosic, J. & Koprowski, H. (1987) Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab.Invest.* 56, 461-474
- Herlyn, M. & Koprowski, H. (1988) Melanoma antigens: Immunological and biological characterization and clinical significance. *Annu.Rev. Immunol.* 6, 283-308
- Holzmann, B., Johnson, J.P., Kaudewitz, P. & Riethmüller, G. (1985) In situ analysis of antigens on malignant and benign cells of the melanocyte lineage. Differential expression of two surface molecules, gp75 and p89. *J.Exp.Med.* 161, 366-377
- Holzmann, B., Bröcker, E.B., Lehmann, J.M., Ruiter, D.J., Sorg, C., Riethmüller, G. & Johnson, J.P. (1987) Tumor progression in human malignant melanoma: Five stages defined by their antigenic phenotypes. *Int. J. Cancer* 39, 466-471

- Houghton, A.W., Albino, A.P., Cordon-Cardo, C. & Eisinger, M. (1987) Cell surface antigens of human melanocytes and melanoma: expression of adenosine deaminase binding protein is extinguished with melanocyte transformation, *J.Exp.Med.* 167, 197-212
- Hubbard, A.G. & Cohn, Z.A. (1976) , In: Maddy A.H.(ed.) *Biochemical Analysis of membranes* Chapman and Hall London. 4-27
- Johnson, J.P., Denner-Dieckmann, M., Meo, T., Hadam, M.R. & Riethmüller, G. (1981) Surface antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies. I. Biochemical characterization of two antigens found on cell lines and fresh tumors of diverse origin, *Eur.J.Immunol.* 11, 825-831
- Johnson, J.P., Stade, B.G., Holzmann, B., Schwäble, W. & Riethmüller, G. (in press) De novo expression of cell adhesion molecule ICAM-1 in melanoma and increased risk of metastasis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, in press
- Johnson, J.P., Stade, B.G., Rothbacher, U., Lehmann, J.M. & Riethmüller, G. (in press) Melanoma cell antigens and their association with malignant transformation and tumor progression, In Ferrone S.(ed.) *Human melanoma, immunology, diagnostics and therapy*, Springer Verlag,
- Kan-Mitchell, J., Inam, A., Kempf, R.A., Taylor, C.R. & Mitchell, M.S. (1986) Human monoclonal antibodies directed against melanoma-associated antigens, *Cancer Res.* 46, 2490-2496
- Klein, G. (1979) Lymphoma development in mice and humans: diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76, 2442-2446
- Klein, G. (1980) Immune and non-immune control of neoplastic development: Contrasting effects of host and tumor evolution, *Cancer* 45, 2486-2498
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity, *Nature* 256, 495-496
- Koprowski, H., Stepiwski, Z., Herlyn, D. & Herlyn, M. (1978) Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75, 3405-3409
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic Acids Res.* 12, 857-872
- Kraemer, K.H., Greene, M.H., Tarone, R., Elder, D.E., Clark, W.H. & Guerry IV, D. (1983) Dysplastic nevi and cutaneous melanoma risk, *Lancet* II, 1076-1077
- Kripke, M. L. (1974) Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light, *J.Natl.Cancer Inst.* 53, 1333-1339
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J.Mol.Biol.* 157, 105-132
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
- Lampson, L. & Levy, R. (1980) Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line, *J. Immunol.* 125, 293-299
- Lehmann, J.M., Holzmann, B., Breitbart, E.W., Schiegelow, P., Riethmüller, G. & Johnson, J. P. (1987) Discrimination between benign and malignant cells of the melanocytic lineage by two novel antigens, a

- glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000, *Cancer Res.* 47, 841-845
- Lipman, D.J. & Pearson, W.R. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches, *Science* 227, 1435-1439
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Marlin, S.D. & Springer, T.A. (1987) Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), *Cell* 51, 813-819
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M. & Hanafusa, H. (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C, *Nature* 332, 272-275
- McGovern, V.J. (1983) *Melanoma histological diagnosis and prognosis*, New York: Raven Press
- Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Früh, K. & Schachner, M. (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin, *Nature* 334, 701-703
- Morgan, A.C., Galloway, D.R. & Reisfeld, R.A. (1981) Production and characterization of monoclonal antibody to a melanoma specific glycoprotein, *Hybridoma* 1, 27-37
- Nakanishi, T. & Basimoto, K. (1987) The differential reactivity of benign and malignant nevomelanocytic lesions with mouse monoclonal antibody TNK-1, *Cancer* 59, 1340-1344
- Nicholson, G.L. & Milas, L. (1984) *Cancer invasion and metastasis: Biological and therapeutical aspects*, New York: Raven Press
- Nishizawa, M., Senba, K., Yoshida, M.C., Yamamoto, T., Sasaki, M. & Toyoshima, K. (1986) Structure, expression, and chromosomal location of the human c-fgr gene, *Mol.Cell.Biol.* 6, 511-517
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations, *Science* 194, 23-28
- Oikawa, S., Iajio, S., Noguchi, T., Kosaki, G. & Makazato, H. (1987) The carcinoembryonic antigen (CEA) contains multiple immunoglobulin-like domains, *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 144, 634-642
- Omry, M.B., Trowbridge, I.S. & Battifora, H.A. (1980) Human homologue of murine T200 glycoprotein, *J.Exp.Med.* 152, 842-852
- Ouchterlony, O. (1970) *Handbook of Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis*, Ann Arbor Science Publishers Inc.
- Pink, J.R.L. & Ziegler, A. (1979) Radiolabelling and characterization of cell surface macromolecules. In: Lefkovitis, I., Pernis, D., (eds.) *Research Methods in Immunology* Academic Press Inc. New York, 169-180
- Poltorak, M., Sadoul, R., Keilhauer, G., Landa, C., Fahrig, R. & Schachner, M. (1987) Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules is involved in neuron-oligodendrocyte interaction, *J.Cell Biol.* 105, 1893-1899
- Poste, G. & Fidler, I.J. (1980) The pathogenesis of cancer metastasis, *Nature* 283, 139-146

- Prehn, R.T. & Main, J.M. (1957) Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J.Natl.Cancer Inst.* 18, 769-778
- Ranscht, B. & Dours, M.T. (1988) Sequence of Contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. *J.Cell Biol.* 107, 1561-1573
- Roebroek, A.J.M., Schalken, J.A., Verbeek, J.S., Van den Ouweland, A.M.W. & Van de Ven, W.J.M. (1985) The structure of the human c-fes/fps proto-oncogene. *EMBO J.* 4, 2897-2903
- Ross, A.B., Grob, P., Bothwell, M., Elder, D.B., Ernst, C.S., Marano, M., Christ, B.F.D., Slemp, C.C., Herlyn, M., Atkinson, B. & Koprowski, B. (1984) Characterization of nerve growth factor receptor in neural crest tumors using monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81, 6681-6685
- Ruiter, D.J., Dingjan, G.M., Steijlen, P.M., Van Reveren-Hooyer, M.T., DeGraff-Reitsma, C.B., Bergman, W., Van Muijen, G.M.P. & Warnnaar, S.O. (1985) Monoclonal antibodies selected to discriminate between malignant melanomas and nevocellular nevi. *J.Invest.Dermatol.* 85, 4-8
- Ryu, S.B., Suh, P.-G., Cho, K.S., Lee, K.-Y. & Rhee, S.G. (1987) Bovine brain cytosol contains three immunologically distinct forms of inositolphospholipid-specific phospholipase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84, 6649-6653
- Sadowski, I., Stone, J.C. & Pawson, T. (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami Sarcoma virus P130gag-tps. *Molec.cell.Biol.* 6, 4396-4408
- Salzer, J.L., Holmes, W.P. & Colman, D.R. (1987) The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: Homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J.Cell Biol.* 104, 957-965
- Sanchez-Madrid, F., Nagy, J., Robbins, E., Simon, P. & Springer, T.A. (1983) A human leukocyte differentiation antigen family with distinct α subunits and a common β subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (CR3/CD35) and the p150.95 molecule. *J.Exp.Med.* 158, 1785-1803
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74, 5463-5467
- Seeger, M.A., Haffley, L. & Kaufman, T.C. (1988) Characterization of analgam: a member of the immunoglobulin superfamily from drosophila. *Cell* 55, 589-600
- Shaw, G. & Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667
- Shiku, H., Takahashi, T., Carey, T.B., Resnick, L.A., Oettgen, H.P. & Old, L.J. (1978) Cell surface antigens of human cancer. In: *Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects*, Ruddon R.W., (ed.) Elsevier North-Holland Inc. New York, 73-90
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.G., Roe, B.A. & Canaani, E. (1986) Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* 47, 277-284
- Sikora, L.K.J., Pinto, A., Dentrack, D.J., Dixon, W.T., Urbanski, S.J., Temple, W. & Jerry, L.M. (1987) Characterization of a novel neuroglandular antigen (NGA) expressed on abnormal human melanocytes. *Int.J.Cancer* 39, 138-145

- Simmons, D., Makgoba, M.W. & Seed, B. (1988) ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM, *Nature* 338, 624-627
- Simon, M.A., Drees, B., Kornberg, T. & Bishop, J.M. (1985) The nucleotide sequence and the tissue-specific expression of *Drosophila* c-src, *Cell* 42, 831-840
- Sober, A.J. (1984) Prognostic factors for cutaneous melanoma. In: *Cutaneous melanoma and precursor lesions* Ruitter, D.J.; Welvaar, K.; Ferrone, S., (eds.) Martinus Nijhoff Publishers Boston, 126-142
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J.Mol.Biol.* 98, 503-508
- Stahl, M.L., Perenz, C.R., Kelleher, K.L., Kriz, R.W. & Knopf, J.L. (1988) Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src, *Nature* 332, 269-272
- Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. & Springer, T.A. (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families, *Cell* 52, 925-933
- Suh, P.-G., Ryu, S.H., Moon, K.H., Suh, H.W. & Rhee, S.G. (1988) Phosphoinositide-specific phospholipase C: complete cDNA sequence and protein sequence, and sequence homology to tyrosine kinase-related oncogene products, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85, in press
- Suh, P.-G., Ryu, S.H., Moon, K.H., Suh, H.W. & Rhee, S.G. (1988) Cloning and Sequence of multiple forms of phospholipase C, *Cell* 54, 161-169
- Suter, L., Brügger, J., Bröcker, E.B. & Sorg, C. (1985) Tumor-associated antigen expressed in melanoma cells with lower malignant potential, *Int.J.Cancer* 35, 787-791
- Takeya, T. & Hanafusa, H. (1983) Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus, *Cell* 32, 881-890
- Towbin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76, 4350-4354
- Watanabe, T., Pukel, C.S., Takeyama, H., Lloyd, K.O., Shiku, H., Li, L.T.C., Travassos, L.R., Oettingen, E.P. & Old, L.J. (1982) Human melanoma antigen AH is an autoantigenic ganglioside related to GD2, *J.Exp.Med.* 156, 1884-1889
- Wickens, M. & Stephenson, P. (1984) Role of the conserved AAUAAA sequence: Four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation, *Science* 226, 1045-1051
- Williams, A.F. (1987) A year in the life of the immunoglobulin superfamily, *Immunol. Today* 8, 298-303
- Williams, A.F. & Barclay, A.M. (1988) The immunoglobulin superfamily - Domains for cell surface recognition, *Annu.Rev.Immunol.* 6, 381-405
- Wilson, B.S., Imai, K., Natali, P.G. & Ferrone, S. (1981) Distribution and molecular characterization of a cell surface and a cytoplasmic antigen detectable in human melanoma cells with monoclonal antibodies, *Int.J.Cancer* 28, 293-300
- Woodbury, R.G., Brown, J.P., Yeh, M.Y., Hellström, I. & Hellström, K.E. (1980) Identification of a cell surface protein p97 in human melanoma and certain other neoplasms, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 77, 2183-2187

Yamashita, Y., Fukushige, S.I., Semba, K., Sukegawa, J., Miyajima, H., Matsubara, K.I., Yamamoto, T. & Toyoshima, K. (1987) The *yes*-related cellular gene *lyn* encodes a possible tyrosine kinase similar to p56lck. *Mol.Cell.Biol.* 7, 237-243

Young, R.A. & Davis, R.W. (1983) Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80, 1194-1198

Abkürzungen

CEA	Carcinoembryonic Antigen
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
MAG	Myelin associated glycoprotein
MHC	Major histocompatibility complex
MoAk	Monoklonaler Antikörper
NCAM	Neural cell adhesion molecule
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PEG	Polyethylenglykol
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
x-GAL	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β -D-Galactopyranosid

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Judith Johnson, die mit Engelsgeduld, Rat und Tat mir zu jeder Zeit hilfreich zur Seite stand.

Ein Dank auch an alle Mitarbeiter des Labors, besonders aber an Dr. Bernhard Holzmann, der mich in die immunologische Methodik einführte und mir bei der Beurteilung von immunohistochemischen Färbungen auf Gewebeschnitten behilflich war.

Prof. Dr. E.W. Breitbart, Dr. E.B. Bröcker, Dr. P. Kaudewitz und Prof. P. Schmiegelow möchte ich für die Überlassung von Gewebeproben danken.

Prof. Dr. G Hartmann möchte ich für die Vertretung der vorliegenden Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Prof. Dr. Gert Riethmüller für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für die Zeit, die er sich immer wieder für Diskussionen nahm.

Gefördert wurde die Arbeit von der Deutschen Krebshilfe, Mildred Scheel Stiftung Bonn, FRG.

Lebenslauf

Ich wurde am 8.8.1959 als Sohn von Dieter und Lieselotte Lehmann, geb. Haase, in Herrsching am Ammersee geboren.

Seit dem 3.1.1986 bin ich mit Almut Goebel verheiratet; am 16.8.1988 kam unser Sohn Felix zur Welt.

Im Frühjahr 1965 wurde ich in die Grundschule von Unna/NRW eingeschult. Im Jahre 1969 wechselte ich an das Gymnasium Ottobrunn über, an dem ich auch im Juni 1979 meine Allgemeine Hochschulreife ablegte. Nach Absolvierung des Grundwehrdienstes in Landsberg und Kempten, nahm ich zum WS 80/81 das Studium der Pharmazie an der LMU München auf. Das Studium schloß ich am 26.4.84 mit dem zweiten Teil der pharmazeutischen Prüfung ab. Nach einjähriger Pharmaziepraktikantenzeit in einer Offizinapotheke erhielt ich am 31.7.85 die Approbation als Apotheker. Seit dem 1.7.85 bin ich am Institut für Immunologie der Universität München, Vorstand: Prof. Dr. G.Riethmüller, als wissenschaftlicher Assistent tätig.

